

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
MICROBIÓLOGA**

**Biodiversidad fúngica endófito y epífita de *Citrus sinensis*, naranjo dulce, de dos  
localidades de la Región Litoral del Ecuador**

**ALEXANDRA ELIZABETH MOYA MALDONADO**

**DIRECTORA: MTR. JENIFFER YÁNEZ ALTUNA**

**QUITO, 2016**

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, ALEXANDRA ELIZABETH MOYA MALDONADO, C.I. 172225708-4, autora del trabajo de graduación intitulado: BIODIVERSIDAD FÚNGICA ENDÓFITA Y EPÍFITA DE *Citrus sinensis*, NARANJO DULCE, DE DOS LOCALIDADES DE LA REGIÓN LITORAL DEL ECUADOR previa a la obtención del grado académico de MICROBIÓLOGA en la Escuela de Bioanálisis:

- 1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
- 2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



ALEXANDRA ELIZABETH MOYA MALDONADO

C.I. 172225708-4

## DEDICATORIA

A Dios

A mi Familia

A mis Amigos

A la PUCE

Al Ecuador

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por todas las bendiciones que me ha dado a través de mis años.

A mi familia por su gran amor. Por ser mi ejemplo de perseverancia, superación, coraje y sabiduría. Por brindarme su apoyo en cada decisión y por no dejarme caer en los momentos difíciles.

A mi directora de disertación, Ingeniera Jeniffer Yánez, por la confianza que ha puesto en mí hasta el día de hoy, por su apoyo durante la realización de este trabajo, por su amistad y comprensión.

A la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por facilitarme el uso de sus instalaciones necesarias en mi investigación. Al personal de cuidado diario de nuestro edificio por la paciencia y el apoyo brindado. A todos los profesores de la carrera de Microbiología por brindarme su conocimiento durante mi transcurso en la universidad.

Agradezco a Carla Garzón PhD. y sus colaboradores por la confianza, calidez y ayuda brindada en el tiempo de estadía en Oklahoma State University.

Millón gracias a mis amigos por estar a mi lado y brindarme su apoyo incondicional en cualquier situación.

Agradezco también al Dr. Marco Guijarro por haber confiado en mí hace 8 años y brindarme mi primera oportunidad de contacto con la Microbiología, por ser un amigo, consejero y un gran ejemplo a seguir.

Finalmente pero no menos importante, agradezco al Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Livexlab por darme la confianza de formar parte de su excelente equipo de trabajo en la actualidad y la oportunidad de formarme profesionalmente.

*Rewards come to the person who is prepared to work hard.*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	Xiii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
1.1.1 Objetivo General.....	3
1.1.2 Objetivos Específicos.....	3
CAPÍTULO II.....	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 EL NARANJO.....	4
2.1.1 Descripción botánica.....	4
2.1.2Características del cultivo.....	5
2.1.3 La naranja.....	6
2.1.3.1 Características.....	6
2.1.3.2 Beneficios de su consumo.....	6
2.1.4 Industrialización del naranjo.....	6
2.1.5 Enfermedades que afectan a la naranja.....	7
2.1.6 La naranja en el mundo.....	8
2.1.7 La naranja en el Ecuador.....	8
2.2 BIODIVERSIDAD.....	9
2.2.1 Ecosistema.....	9
2.2.2 Microorganismos en los ecosistemas.....	10
2.2.3 Ecosistema vegetal.....	11
2.2.3.1 Microecosistema epífita.....	12

2.2.3.2	Microecosistema endófito.....	14
2.2.4	Biodiversidad de hongos endófitos y epífitos en el mundo.....	17
2.2.5	Análisis de patrones de biodiversidad.....	19
2.2.5.1	Diversidad Alfa.....	19
2.2.5.2	Diversidad Beta.....	21
2.3	GENÓMICA.....	21
2.3.1	Secuenciación de DNA.....	22
2.3.2	Bioinformática.....	23
2.3.3	La reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	23
2.3.3.1	Espaciador Transcrito Interno.....	24
2.3.4	Análisis filogenético.....	26
2.3.4.1	Método <i>Neighbor-Joining</i> (NJ).....	26
2.3.4.2	Bootstrap.....	26
CAPÍTULO III	.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS	.....	28
3.1	Tipo de estudio y Técnica de muestreo.....	28
3.2	Equipos y materiales.....	28
3.2.1	Materiales usados en el estudio.....	28
3.2.2	Equipos usados en el estudio.....	30
3.3	Métodos.....	30
3.3.1	Recolección y traslado de muestras.....	30
3.3.2	Aislamiento de hongos epífitos.....	31
3.3.3	Aislamiento de hongos endófitos.....	32
3.3.4	Obtención de cultivos puros.....	32
3.3.5	Extracción de ADN de hongos aislados.....	33
3.3.6	Cuantificación de ADN.....	33
3.3.7	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	34
3.3.8	Secuenciación de ADN.....	34
3.3.9	Análisis de Patrones de Biodiversidad.....	35
3.3.10	Análisis Filogenético.....	36

CAPÍTULO IV.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
4.1 Hongos endófitos y epífitos obtenidos de <i>Citrus sinensis</i> .....	37
4.2 Identificación molecular de hongos aislados de <i>Citrus sinensis</i> .....	37
4.2.1 Endófitos en muestras sintomáticas de <i>Citrus sinensis</i> .....	39
4.2.2 Epífitos en muestras asintomáticas de <i>Citrus sinensis</i> .....	43
4.2.3 Endófitos en tejido sintomático y epífito en tejido asintomático.....	44
4.2.4 Pérdida de información.....	45
4.2.5 Endófitos y epífitos fúngicos como antagonistas.....	46
4.3 Análisis de patrones de biodiversidad existentes en la micoflora de <i>Citrus sinensis</i> .....	47
4.4 Filogenia fúngica encontrada en <i>Citrus sinensis</i> mediante el método de <i>Neighbor joining</i> .....	52
CONCLUSIONES.....	56
RECOMENDACIONES.....	58
REFERENCIAS.....	59
ANEXOS.....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

<p>Figura 1. Países productores de naranja alrededor del mundo. Círculos rojos representan al país productor. Por la <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division</i>, 2013.....</p>	8
<p>Figura 2. Cromatograma obtenido tras la secuenciación de la región ITS1-5.8S, rRNA-ITS2 de uno de los hongos aislados de <i>Citrus sinensis</i> y visualizado en el programa Mega 6.....</p>	22
<p>Figura 3. Subunidades del genoma fúngico, genes ribosomales y espaciadores transcritos internos (ITS 1 e ITS2). Por Camarena, 2012, Revista Chapingo, 18 (3), p. 418.....</p>	25
<p>Figura 4. Naranjas con lesiones superficiales provenientes de Quevedo-Los Ríos (A, B, C). Naranjas con lesiones superficiales provenientes de El Empalme-Guayas (D, E, F). .....</p>	31
<p>Figura 5. Proceso de extracción de ADN fúngico. Laboratorio de Investigaciones de la Escuela de Bioanálisis.....</p>	33
<p>Figura 6. Porcentaje de hongos aislados en Quevedo-Los Ríos y El Empalme-Guayas, región litoral, 2015. ....</p>	37
<p>Figura 7. Hongos endófitos y epífitos aislados en Quevedo- Los Ríos y El Empalme-Guayas, región litoral ecuatoriana.....</p>	38
<p>Figura 8. Algunos aislados fúngicos con crecimiento micelial abundante provenientes de Quevedo-Los Ríos (A, B, C) y El Empalme-Guayas (D, E, F) que no pudieron ser identificados molecularmente.....</p>	45
<p>Figura 9. Índice de Margalef (<math>D_{Mg}</math>) de hongos endófitos y epífitos de la localidad de Quevedo-Los Ríos y de El Empalme-Guayas del litoral ecuatoriano.....</p>	48
<p>Figura 10. Índice de Simpson (<math>D</math>) de hongos endófitos y epífitos de la localidad de Quevedo-Los Ríos y de El Empalme-Guayas del litoral ecuatoriano.....</p>	49
<p>Figura 11. Índice de Shannon-Wiever (<math>H'</math>) de hongos endófitos y epífitos de la localidad de Quevedo-Los Ríos y de El Empalme-Guayas del litoral ecuatoriano.....</p>	50
<p>Figura 12. Representación gráfica de especies compartidas de hongos endófitos y epífitos entre la localidad de Quevedo-Los Ríos y de El Empalme Guayas del litoral ecuatoriano.....</p>	51

Figura 13. Árbol filogenético *NJ* correspondiente a la relación de hongos endófitos y epífitos aislados de muestras de *Citrus sinensis* de dos localidades de la región litoral..... 53

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo estandarizado para la amplificación de la región ITS del ADN de hongos.....	34
Tabla 2. Identificación molecular basada en la región ITS de hongos en tejido del fruto (TN), en superficie del fruto (SN) y superficie de hojas (HN) de <i>Citrus sinensis</i> pertenecientes a la localidad de Quevedo-Los Ríos.....	42
Tabla 3. Identificación molecular basada en la región ITS de hongos en superficie del fruto (SN) y superficie de hojas (HN) de <i>Citrus sinensis</i> pertenecientes a la localidad de El Empalme-Guayas.....	44
Tabla 4. Número de individuos. Riqueza de hongos endófitos y epífitos identificados en Quevedo-Los Ríos y El Empalme-Guayas de la región litoral.....	47

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Porcentaje de producción de naranja por regiones.....	73
Anexo 2. Toneladas de producción de los 5 mejores productores de naranja del mundo.....	73
Anexo 3. Cinco países con mejor rendimiento del cultivo en producción.....	73
Anexo 4. Base de datos importantes en Bioinformática.....	74
Anexo 5. Ciclo de vida propuesto para hongos endófitos tropicales en su planta hospedera.....	75
Anexo 6. Algunas hojas sin lesiones provenientes de El Empalme-Guayas.....	75
Anexo 7. Protocolo de extracción de ADN.....	76
Anexo 8. Uso del espectrofotómetro NanoDrop.....	77
Anexo 9. Comprobación de existencia de producto de PCR provenientes de hongos presentes en <i>Citrus sinensis</i> .....	77
Anexo 10. Algunas secuencias consensus siendo procesadas en Mega .....	77

## RESUMEN

La naranja dulce, *Citrus sinensis*, es cultivada y comercializada en todo el mundo. La biodiversidad fúngica endófito y epífita de esta especie vegetal proveniente de dos localidades de la región litoral del Ecuador fue investigada. Un total de 96 muestras (hojas sanas, frutos sanos y frutos con presencia de lesiones superficiales) de la localidad de Quevedo-Los Ríos y El Empalme-Guayas, fueron procesadas en los laboratorios de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Cuarenta y nueve hongos tanto endófitos como epífitos se aislaron. Para la identificación molecular, se realizaron extracciones de ADN y secuenciaciones de la región ITS de los genes ribosomales. Mediante la herramienta BLAST se comparó las secuencias del estudio con las del Banco de Genes del NCBI, de esta forma se identificaron treinta y tres hongos a nivel de género y se obtuvieron 18 especies distintas. Tanto en la micobiota endófito como epífita, *Epicoccum* sp. fue el género más abundante. *E. nigrum* fue la especie epífita más aislada; mientras que *Fusarium* sp. fue el segundo género endófito más frecuente. La diversidad de hongos endófitos y epífitos fue determinada utilizando los índices ecológicos: Riqueza de especies, Margalef, Shannon-Viewer, Simpson y Jaccard. La localidad de Quevedo posee una mayor riqueza de especies y un índice de Margalef mayor (4.6). Además, los resultados sugieren que Quevedo posee alta heterogeneidad ( $H=2.58$ ) mientras que la localidad de El Empalme muestra una dominancia de especies mayor ( $D=0.18$ ) especialmente del hongo *Epicoccum nigrum*. Únicamente tres especies fueron compartidas por las dos localidades *Epicoccum nigrum*, *Epicoccum* sp. y *Leptosphaerulina chartarum* ( $I_j=0,38$ ). Este estudio demuestra que, *Citrus sinensis* está constituido por micobiota endófito y epífita variada. El análisis filogenético basado en el método *Neighbor-Joining* generó un dendograma con Ascomycota como grupo general y cinco grupos internos pertenecientes a la subdivisión Pezizomycotina.

## ABSTRACT

Sweet orange, *Citrus sinensis*, is grown and marketed around the whole world. The endophytic and epiphytic fungal biodiversity of this plant from two locations in the Ecuadorian coast were studied. Ninety-six samples of leaves, healthy fruits and superficial lesions from Quevedo-Los Ríos and El Empalme-Guayas localities were processed at the laboratories of the School of Bioanalysis at the Pontifical Catholic University of Ecuador. Forty nine endophytic and epiphytic fungal were isolated. DNA extraction and ribosomal region sequencing were used to compare by BLAST in NCBI GenBank. As a result, 33 genera and 18 species were identified. *Epicoccum* sp. was the genus most abundant in endophytic and epiphytic mycobiota. *Epicoccum nigrum* was the epiphytic specie more isolated and *Fusarium* sp. was the second endophytic genus most frequently isolated. The endophytic and epiphytic mycobiota diversity was determined using the ecological index: Species Richness, Margalef, Shannon-Wiener, Simpson and Jaccard. Quevedo locality has a high species Richness and a Margalef index (4.6). Furthermore, Quevedo has a high heterogeneity ( $H' = 2.58$ ), at the same time El Empalme locality shows a high species dominance ( $D = 0.18$ ), specially of *Epicoccum nigrum*. Only three species were similar between these localities *Epicoccum nigrum*, *Epicoccum* sp. and *Leptosphaerulina chartarum* ( $I_j = 0.38$ ). *Citrus sinensis* consist of a variety of endophytic and epiphytic mycobiota. Neighbor-Joining phylogenetic analysis expulsed a dendogram where Ascomycota was the general group and five internal groups belonged to the Pezizomycota subdivision.

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

*Citrus sinensis* (L. Osbeck), conocido como naranjo, es un cultivo común en zonas con clima tropical. La fruta generada por este árbol es llamada comúnmente “naranja”. En el Ecuador, el cultivo de naranja es importante y se produce en distintos lugares del país. De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), el cultivo de naranja abarcó 6 529 hectáreas de terreno; como consecuencia se generaron 22.607 toneladas métricas de naranja de las cuales 21.016 fueron vendidas a nivel nacional (INEC, 2013a).

Sin embargo, el cultivo de naranja es susceptible a enfermedades producidas principalmente por hongos como la sarna de la naranja dulce (Kunta, 2013) y la mancha negra del cítrico (Etebu y Nwauzoma, 2014; McBride, French, Schuster y Ong, 2010). Además, se han reportado casos en donde diferentes hongos fitopatógenos provocan destrucción del tejido de la naranja con la aparición de lesiones en la etapa de post-cosecha (Ochoa, Hernández-Montiel, Latisnere-Barragán, León de La Luz y Larralde-Corona, 2007). En el año 2013, el INEC (2013b) reportó en la región litoral ecuatoriana una pérdida de 37 hectáreas por la presencia de enfermedades en el cultivo de naranja.

En el Ecuador los estudios de la diversidad fúngica endófito y epífita son escasos. Las investigaciones se han centrado en el análisis de la biodiversidad en plantas medicinales y frutales como el banano, tomate y sandía (Espinoza, Jiménez y Peralta 2009; Ramírez, Delgado, Rodolfi y Solveig, 2006).

Sin embargo, a nivel mundial, se han realizado varios estudios de la microbiota epífita y endófito en varias plantas tanto asintomáticas como sintomáticas con el propósito de evaluar su diversidad microbiana y posibles formas de biocontrolar enfermedades (Alvindhia y Natsuaki, 2008; Salas, 2010; Douanla-Meli, Langer y Moufao, 2013; Khan, Shahzad, Choudhary, Khan y Ahmad 2007; Kumar y Hyde, 2004; Palou, Usall, Pons y Viñas, 2001). En plantas medicinales, se ha encontrado la presencia de hongos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Guignardia* sp., *Glomerella cingulata*, *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phyllosticta* sp. (Kumar y Hyde, 2004), *Aspergillus* sp. *A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium sublateritium*, *Phoma* sp., *P. chrysanthemicola*, *P. hedericola* y *Candida albicans* (Khan et

al., 2007). En hojas sanas de eucalipto aromático (*Eucalyptus citriodora* Hook) se ha encontrado que *Cladosporium cladosporioides* predomina en tejido superficial mientras que *Botrytis cinerea* prefiere habitar en tejido interno (Kharwar et al., 2010).

Por otro lado, en plantas de interés comercial como el café se reporta la predominancia endófito y epífita de *Cladosporium* sp. en los diferentes tipos de muestras (Salas, 2010) y en un estudio de epífitos de la banana se menciona la presencia de hongos como *Thielaviopsis paradoxa*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium verticillioides*, *Clonostachys byssicola*, *Curvularia pallescens*, *Penicillium oxalicum* y *Trichoderma harzianum* (Alvindhia y Natsuaki, 2008). Finalmente, en plantas frutales como *Citrus limón* (limón) se ha encontrado hongos como *Cladosporium* sp. y *Penicillium* sp. (Palou et al., 2001). En hojas sanas se halló con mayor frecuencia a *Mycosphaerellaceous* sp. Mientras que en hojas enfermas se encontró a *Colletotrichum gloeosporoides* (Douanla-Meli et al., 2013).

El conocimiento de la diversidad de hongos presentes en diferentes tejidos de *Citrus sinensis*, es importante pues se genera información sobre los tipos de microorganismos fúngicos presentes e identifica a aquellos que constituyen flora normal de la naranja dulce, y cuales son potenciales patógenos para esta. Al identificar los microorganismos propios del fruto se podrá encontrar aquellos hongos con características antagónicas que puedan ejercer esta propiedad intrínsecamente (Backman y Sikora, 2008). El beneficio de conocer hongos antagonistas radica en que estos pueden ser usados para realizar estudios de antagonismo *in vitro* que es el primer paso para controlar a los patógenos que causan diferentes enfermedades en la naranja dulce (Quiroz, Ferrera, Alarcón y Lara, 2008).

Las escasas investigaciones enfocadas en la diversidad fúngica tanto endófito como epífita en nuestro país no han generado información suficiente para el conocimiento de la biodiversidad existente en cítricos. En particular, no existen estudios enfocados al análisis de la micoflora en los diferentes tejidos de *Citrus sinensis*, debido a esto el presente estudio pretende responder la siguiente pregunta: ¿Cuál es la biodiversidad fúngica endófito y epífita presente en lesiones y superficies sanas de diferentes tejidos de *Citrus sinensis* de dos localidades de la región litoral del Ecuador?

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo General

- Evaluar la biodiversidad fúngica endófito y epífita de *Citrus sinensis*, naranja dulce, de dos localidades de la región litoral del Ecuador.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Aislar hongos endófitos provenientes de tejido con presencia de lesiones superficiales del fruto de *Citrus sinensis*.
- Aislar hongos epífitos de tejido sano de frutos y hojas de *Citrus sinensis*.
- Determinar las especies de hongos endófitos y epífitos que están presentes en *Citrus sinensis* mediante secuenciación del ADN.
- Analizar los patrones de biodiversidad existentes en la micoflora de *Citrus sinensis* utilizando varios índices de diversidad.
- Analizar la filogenia fúngica encontrada en *Citrus sinensis* mediante el método de *Neighbor-Joining*.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. EL NARANJO

El naranjo pertenece al reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Sapindales, familia Rutaceae, género *Citrus* y especie *sinensis* (L. Osbeck) (Orwa et al., 2009). Esta planta genera frutos llamados comúnmente “naranjas”. Esta planta se originó en el sudeste de Asia, ha sido cultivada y consumida desde hace miles de años. Es considerado un cultivo perenne pues su vida útil es mayor a un año (Orozco y Somarriba, 2005).

##### 2.1.1 Descripción botánica

En condiciones ambientales y nutricionales favorables, el árbol de naranjo posee un tamaño mediano entre los 7.5 y 13 m de altura y en ocasiones alcanza hasta los 15m (Etebu y Nwauzoma, 2014; Orwa et al., 2009; Stephenson, Morss y Burnett, 1834). Su único tallo posee una corteza fina y lisa (Manner, Buker, Easton, Ward y Elevitch, 2006). Según Agusti (2003), el naranjo al tener un tallo tipo leñoso está provisto de un crecimiento longitudinal debido a los meristemos apicales (raíces) y un crecimiento en su grosor debido al cambium (tejido meristemático). Se encuentra provisto de gran cantidad de ramificaciones y estas en ocasiones están decoradas con espinas.

Sus hojas son lisas, de un color verde brillante, con forma ovalada, generalmente de 5-15cm x 2-8cm. Las flores surgen de las ramificaciones; estas son pequeñas y fragantes. Sus pétalos son cinco, alargados (1.3 cm -2.2 cm), cóncavos, de color blanco y contienen pequeñas glándulas; las flores al ser hermafroditas producen néctar para la polinización mediante insectos (Etebu y Nwauzoma, 2014; Orwa et al., 2009; Stephenson, Morss y Burnett, 1834). A pesar que su floración haya ya comenzado, los frutos de este árbol empiezan a crecer entre los 3 y 5 años (Orwa et al., 2009). En la fase de formación del fruto, las flores logran un desarrollo fisiológico completo generando el fruto maduro. El tiempo de producción de naranja dependerá de varios factores como la especie, el cultivar y las condiciones ambientales (Hernández, 2014).

### **2.1.2 Características del cultivo**

Este tipo de cultivo crece en regiones con climas tropicales, semi-tropicales y algunos cálidos templados (FAOWATER, 2013; Orwa et al., 2009; Piccinelli et al., 2008) siendo uno de los cultivos más comunes alrededor del mundo. En climas tropicales es cultivado sobre los 1.800 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m) y en climas subtropicales sobre los 750 m.s.n.m. ; además de estar situados entre 40 °N y 40 °S (FAOWATER, 2013).

La temperatura óptima de crecimiento del cultivo es entre 23 °C y 30 °C, el rendimiento se reduce cuando se encuentra sobre los 38 °C o bajo los 13 °C. Temperaturas más bajas ocasionan diferentes afecciones como la marchitez de sus ramas (-8 °C) y la muerte total del árbol (-10 °C). Las flores y los frutos jóvenes son susceptibles al frío, inhibiendo su normal crecimiento y en ambientes con viento estas suelen caer con facilidad (FAOWATER, 2013). Este tipo de cultivo no se encuentra adaptado a trópicos húmedos, ya que una humedad elevada constante lo hace proclive a pestes y enfermedades (FAOWATER, 2013; Orwa et al., 2009).

El suelo donde se encuentre cultivado debe ser profundo con el fin de que sus raíces primarias logren penetrarlo 1 o 2 m, mantenerse a una temperatura mayor a 12 °C, asegurar su actividad de crecimiento y proveer de suficiente aireación. La presencia y disponibilidad de magnesio y elementos traza como zinc, cobre y manganeso son muy importantes (FAOWATER, 2013). El suelo debe estar bien drenado (libre de agua estancada), poseer un pH de 5-8 y evitar excesos de salinidad (FAOWATER, 2013; Orwa et al., 2009).

Al ser un cultivo perenne, el naranjo transpira constantemente por todo el año. Los requerimientos de agua varían de acuerdo a las condiciones ambientales y condiciones del cultivo (limpieza, uso de químicos, cobertura del suelo) en las que se encuentre. Según Orwa et al. (2009), la cantidad anual de lluvia que necesita este cultivo se encuentra entre los 900- 2500 mm y FAOWATER (2013), afirma que se requiere de 900 a 1200 mm por año.

### **2.1.3 La Naranja**

#### *2.1.3.1 Características*

La naranja es una baya carnosa, posee una forma redonda a ovoide, un tamaño variable y en ocasiones se nota su maduración con el cambio de color que sufre de verde a anaranjado o amarillo (Hernández, 2014). Anatómicamente, en el fruto se logra evidenciar dos regiones el pericarpio y el endocarpio. La primera región es llamada piel o cáscara, la cual cubre a todo el fruto y el lugar donde se alojan hongos y bacterias endófitas (Etebu y Nwauzoma, 2014). La segunda región tiene una consistencia carnosa dividiéndose de 10 a 14 segmentos gracias a tabiques delgados que se desarrollan dentro de esta; aquí se aloja la pulpa y por consiguiente las vesículas que contienen el jugo. La pulpa es dulce y presenta semillas dependiendo de la variedad (Etebu y Nwauzoma, 2014; Hernández, 2014).

#### *2.1.3.2 Beneficios de su consumo*

A nivel nutricional, la naranja posee muy pocas calorías, fibras solubles, bajo contenido de grasa, alta cantidad de ácido ascórbico (Vitamina C), diferentes vitaminas y elementos traza, etc (Moreiras, Carbajal, Cabrera y Cuadrado, 2010; United State Department of Agriculture, 2015). Además, la naranja se caracteriza por la presencia de diferentes tipos de carotenoides, ácidos orgánicos como el ácido málico y de flavonoides (Etebu y Nwauzoma, 2014; Fundación Española de la Nutrición, s.f.; Peterson et al., 2005). Componentes no nutricionales presentes en la naranja generan beneficios en la salud del consumidor debido a sus propiedades antioxidantes, anti inflamatorias, anti cancerígenas, además de la ayuda que proporcionan en problemas de obesidad y la esclerosis (Etebu y Nwauzoma, 2014).

### **2.1.4 Industrialización del naranjo**

Debido a sus características, el árbol es muy útil en la industria apícola mientras que la cáscara de la naranja es usada en la industria avícola. Según la investigación de Olumei, Ojighen y Ejembi (2006) el implemento de cáscara de *Citrus sinensis* en la alimentación de pollos de engorde puede reemplazar la dieta del maíz en un 15%. Además, diferentes partes

como las hojas y frutos pueden ser utilizados en la industria farmacéutica. Adicionalmente, las hojas, la flores del naranjo y la cáscara de la naranja participan en la producción de aceites esenciales (Muhoho, ThiLan Phi y Sawamura, 2009; Orwa et al., 2009). Un ejemplo claro del uso de los diferentes componentes de la naranja, fue el estudio de la capacidad antioxidante que posee la cáscara de *Citrus sinensis*, la cual tiene compuestos fenólicos y flavonoides como glucósidos de flavanona, flavonas y flavolones. Gracias a esta característica, la cáscara puede ser usada tanto en la industria alimenticia como farmacéutica (Anagnostopoulou, Papageorgiou, Assimopoulou y Boskou, 2006). En la industria alimenticia, la naranja es consumida en forma de productos derivados (zumos, etc) o en fruta entera. Para el suministro de fruta fresca o productos derivados de la naranja al consumidor, el mercado internacional de producción se encuentra basado en el CODEX ALIMENTARIUS. Según el CODEX STAN 245-2004, MOD (Standard for Oranges), las naranjas de calidad deben ser aptas para el consumidor. Los frutos deben estar sanos, sin afecciones de podredumbre o deterioro por infecciones, exentos de daño por plaga, etc., que afecten su imagen y posterior procesamiento.

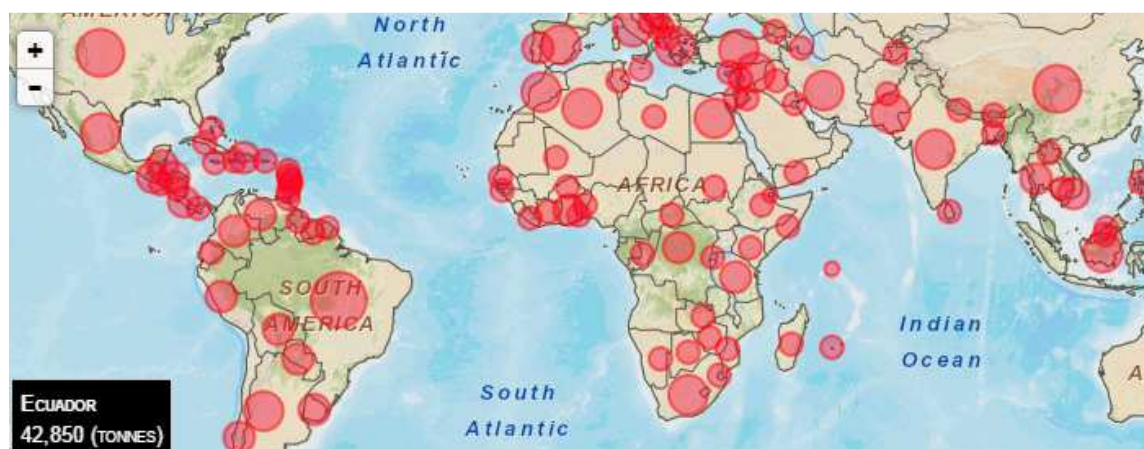
### **2.1.5 Enfermedades que afectan a la naranja**

El árbol del naranjo, al igual que sus frutos, es susceptible a diferentes tipos de enfermedades las cuales son causadas por una gran variedad de patógenos. Las enfermedades producidas por virus son: la tristeza del naranjo (*Closterovirus*) (Etebu y Nwauzoma, 2014; Rogg, 2000) y el virus de la familia Mandarivirus productor de la mancha anular cítrica (CRSV) (Etebu y Nwauzoma, 2014; Tidora y Darai, 2011). Este cultivo es atacado también por patógenos bacterianos produciendo enfermedades como: la clorosis de los cítricos (*Xanthomonas fastidiosa*), la chancrosis de los cítricos (*Xanthomonas axonopodispv. citri*), el enverdecimiento de los cítricos (*Candidatus Liberibacter species*) (Etebu y Nwauzoma, 2014; McBride et al., 2010). Los patógenos fúngicos generan enfermedades como la mancha negra de los cítricos (*Guignardia citricarpa*-anamorfo *Phyllosticta citricarpa*), melanosis (*Diaporthe citri*), la sarna de la naranja (*Elsinöe australis*) (Etebu y Nwauzoma, 2014; McBride et al., 2010), la pudrición de la raíz (*Phytophthora* spp.) (McBride et al., 2010) y el mildiu producido por *Acrosporium tingitatum* (Etebu y Nwauzoma, 2014). Otras enfermedades fúngicas que se

encuentran específicamente en el fruto son las generadas por los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, comúnmente en la etapa de post-cosecha y almacenamiento (Ochoa et al., 2007).

### 2.1.6 La naranja en el mundo

La naranja dulce es cultivada y comercializada en todo el mundo (FAOSTAT, 2013; Orwa et al., 2009) (figura 1). FAOSTAT (2013) menciona la producción de este tipo de fruta en los cinco continentes, aunque la lista estuvo liderada por América con una producción del 47.7 % y Asia con 31.4 % (anexo 1). En el año 2013, los cinco mejores productores del mundo fueron Brasil, Estados Unidos de América, China, China Continental e India. Brasil encabezó este listado con un total de 17.549.536.00 toneladas de naranja (anexo 2). En el ámbito de aprovechamiento de hectáreas y producción generada son otros países los protagonistas: Ghana, Sud África, Albania, Turquía e Indonesia. De este grupo, Ghana tuvo el mejor rendimiento del cultivo en términos de producción con un total de 390.100 de hectáreas productoras (anexo 3) (FAOSTAT, 2013).



**Figura 1. Países productores de naranja alrededor del mundo (círculos rojos representan al país productor). Por la Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division, 2013.**

### 2.1.7 La naranja en el Ecuador

La producción de naranja en las diferentes regiones del Ecuador se debe principalmente a la situación geográfica en la que el país se encuentra, pues posee un clima apropiado para la

producción. En el 2013, FAOSTAT reportó la producción de 42.850 toneladas de naranja en el territorio ecuatoriano. En el mismo año el INEN reportó 6.529 hectáreas plantadas con árboles de naranja de las cuales un total de 5.959 hectáreas fueron cosechadas; como resultado se produjo 22.607 toneladas de naranja y de estas un total de 21.016 se vendieron a nivel nacional. La región litoral generó 5.113 toneladas métricas de naranja de las cuales vendió 4.720. La provincia del Guayas, tuvo 172 hectáreas plantadas con una producción de naranja de 259 toneladas métricas; mientras que, la provincia de Manabí presentó 613 hectáreas plantadas generando 1.521 toneladas métricas del fruto fresco de naranja (INEC, 2013a). A pesar que esta fruta es una de las de mayor producción en Ecuador, Heredia (2007) mencionó que esta se limita solamente al mercado y consumo interno sin tener la orientación exportable. Después de cuatro años se reportó 2% de exportaciones de naranja de Ecuador al mundo (PRO ECUADOR, 2012).

## **2.2. BIODIVERSIDAD**

### **2.2.1 Ecosistema**

La ecología comprende el estudio de la biosfera, es decir, el estudio de todo lo biótico (vida) y lo abiótico (sin vida) dentro de un ambiente o sus alrededores (Dellosa, 2008). La biosfera comprende la zona de la Tierra donde se desarrolla la vida. En ella podemos encontrar diferentes tipos de ecosistemas (Dellosa, 2008; García, 2009). Un ecosistema es un conjunto compuesto de organismos vivos de diversas especies (biocenosis) que interactúan con su espacio y medio ambiente (biotopo o hábitat). El biotopo condiciona a las especies que se encuentran presentes allí, generando así tres tipos de ecosistemas: macroecosistemas, mesoecosistemas y microecosistemas. El macroecosistema comprende extensiones enormes de terreno (mar), el mesoecosistema se refiere a extensiones de mediano tamaño (bosque, río) y el microecosistema comprende pequeñas dimensiones como un charco, rocas, rama de un árbol, hojas, flores, frutos, etc. (García, 2009).

El concepto de especie hace referencia al conjunto de organismos, microorganismos o poblaciones con capacidad de unirse y producir descendencia viable y fértil entre sí, pero sin poder efectuar lo mismo con poblaciones pertenecientes a otro conjunto de organismos, microorganismos o poblaciones (Cambell y Reece, 2007). Las especies pueden ser

definidas en cuatro formas: el concepto morfológico, en donde especie es un conjunto de organismos morfológicamente diferentes; el concepto biológico, donde especie es un grupo de organismos diferenciados por su tipo de reproducción, el concepto evolutivo en el cual especie posee linajes evolutivos independientes; y el concepto filogenético, donde especie se define al grupo de organismos que poseen al menos una característica similar que no estuvo en sus ancestros (Pedroni y Morera, 2002). Según Maczulak (2010), el estimado de especies en el mundo es incierto puesto que hay especies aun no descubiertas; científicos han identificado insectos, animales, plantas, hongos, protistas y procariotas generando porcentajes de 54 %, 20 %, 17 %, 4.7 %, 4 % y 0.3 % respectivamente. Un total de 1.4 millones de especies han sido identificados, representando únicamente el 10 % de todas las especies de la Tierra.

La **biodiversidad** se refiere a las especies de un lugar, zona, región y hábitat determinado. Se la puede definir basándose en diferentes aspectos: la diversidad de especies comprende a las especies, la diversidad genética asume la totalidad de genes presentes, la diversidad de ecosistemas, diversidad ecológica comprende las interacciones entre ecosistema y la diversidad funcional relaciona las interrelaciones funcionales de la biota con su ecosistema (Audesirk, Audesirk y Byers, 2003; Maczulak, 2010; Pedroni y Morera, 2002). La **diversidad de especies** comprende la riqueza e igualdad o equidad de especies. El número de especies presentes en un área representa la riqueza, mientras que la abundancia de cada especie en un área hace referencia a la igualdad o equidad (Maczulak, 2010).

### **2.2.2 Microorganismos en los ecosistemas**

Los microorganismos se encuentran habitando cualquier nicho ecológico de la Tierra; desde trópicos hasta regiones extremadamente frías, desde minas hasta montañas, desde desiertos hasta mares; son capaces de soportar toda clase de cambio climático y adaptarse a ellos (Xu, 2006). Según Anaya (2003), todos los sitios del planeta que somos capaces de imaginar constituyen hábitats o áreas donde los microorganismos pueden vivir. Como ejemplos claros de hábitats que componen los diferentes ecosistemas tenemos a la tierra, el aire, el agua dulce, salada, marina, la rizósfera (zona cercana a raíces), el hombre y los animales (en su exterior e interior), las plantas y sus órganos (hojas, raíces, tallo) tanto en su superficie como dentro del tejido, etc.

El estudio de las interacciones que poseen los microorganismos entre ellos y la interacción de estos con su medio ambiente se denomina Ecología Microbiana. Este estudio se centra en dos parámetros: a) la diversidad microbiana que se refiere al aislamiento, identificación y cuantificación de los microorganismos en los hábitats y b) la actividad microbiana que estos seres poseen en los ciclos bioquímicos. Al igual que en la diversidad de especies mencionada anteriormente, la diversidad microbiana puede ser medida por varios índices como la diversidad filogenética, de especies, genotípica y de genes. Estas medidas pueden ser: a) las que cuantifican el número de especies conocido como riqueza y b) las que identifican la frecuencia de cada una de estas especies en el ambiente (Xu, 2006).

### **2.2.3 Ecosistema vegetal**

Cada planta alrededor del planeta se encuentra en contacto con el viento, posee una interacción directa con el suelo, las plantas a su alrededor, y las condiciones que el hombre maneje y proporcione. Según Anaya (2003), el vegetal (considerando todas sus partes) constituye un ecosistema, el cual está en constante interacción con microorganismos tanto benéficos como patógenos presentes y provenientes del ambiente. Como resultado de esta constante interacción ambiental la planta posee microorganismos en su superficie (epífitos) además de microorganismos con capacidad de ingresar a sus tejidos (endófitos) (Osono, 2008). Estos dos tipos de microorganismos pueden ser patógenos para la planta o simplemente no causar ningún efecto contra esta (Arnold, 2007; Hernández, 2001; Schurlz y Boyle, 2005; Whipps, Hand, Pink y Bending, 2008).

Debido a la variedad del ambiente en el cual la planta se halla, los posibles microorganismos que el ambiente puede acarrear o los microorganismos con los cuales se debe enfrentar hasta su senescencia, los vegetales poseen diferentes mecanismos de defensa. Los mecanismos de defensa propios del hospedero hacen referencia a a) las defensas morfológicas o estructurales antes y después de la infección, y b) las defensas bioquímicas que la planta posee y genera (Agrios, 2005; Mehrotra y Aggarwal, 2013).

Los mecanismos morfológicos o estructurales de defensa contra algún patógeno antes del contacto con este engloba a la cutícula, la cera presente en la superficie vegetal, el ácido sílico presente en la epidermis y la capacidad de las aberturas naturales de la planta

(estomas) de crear un ambiente bajo en humedad para causar deshidratación del patógeno. Además de eso, algunos tipos de plantas poseen estructuras celulares diferentes. Los cereales poseen una gran cantidad de células esclerenquimas que cumplen la función de prevenir infecciones en el interior. En cambio, al producirse ya una infección, las plantas pueden generar cambios o alteraciones estructurales en su tejido para su autoprotección como la generación de capas de corcho, tilosas, capas de abscisión, depósitos de goma y resinas (Agrios, 2005; Mehrotra y Aggarwal, 2013; Sharma, 2004).

Las defensas bioquímicas de la planta pueden presentarse naturalmente, al igual que las defensas morfológicas, en la composición de la planta como en situaciones después del contacto con el patógeno. Sustancias inhibitorias presentes en las células de la planta, sustancias fenólicas, fitoalexinas, presencia de ipomeamarone, pisatin, variedad de enzimas y proteínas, etc., son sustancias químicas que de acuerdo al tipo de planta (especie-genética) se presentan para poder combatir contra el patógeno; además, algunas variaciones de pH, cambios en la presión osmótica y en la permeabilidad celular, las defensas inmunológicas contra el antígeno, la limitación de oxígeno y la limitación de nutrientes por parte de la planta hacia el patógeno son acciones que el vegetal realiza para detener y controlar una infección (Agrios, 2005; Mehrotra y Aggarwal, 2013).

#### *2.2.3.1 Microecosistema epífita*

La anatomía vegetal posee muchas partes que se encuentran en continua interacción con la atmósfera, tal es el caso del tallo, hojas, flores y frutos. La superficie de cada una de estas partes constituye un hábitat llamada filósfera (Whipps et al., 2008). La filósfera global es considerada un hábitat de la tierra con alrededor de  $10^8$  km<sup>2</sup> (Morris y Kinkel, 2002).

Según Mercier y Lindow (2000), la superficie de la hoja y frutos posee una innumerable cantidad de compuestos orgánicos o inorgánicos como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, minerales. El tipo de planta y la edad de la hoja se encuentran directamente relacionados con estas características. Además, este ecosistema rico en nutrientes brinda un adecuado soporte para el crecimiento extenso de microflora.

La filósfera es un ecosistema dinámico y repleto de diferentes poblaciones microbianas. La microbiota que habita la filósfera puede estar compuesta por bacterias, levaduras, hongos filamentosos, y en ocasiones protozoarios y algas (Lindow y Brandl, 2003; Whipps et al., 2008). Estos microorganismos son conocidos como microorganismos epífitos.

Los microorganismos epífitos logran colonizar la filósfera, a pesar de las condiciones extremas que el hábitat superficial de la planta presenta por encontrarse directamente expuesto al medio ambiente. La exposición a temperaturas extremas, radiación solar, falta de humedad y limitaciones de fuentes de agua, e inclusive el ambiente químico que el hombre ha llegado a producir en cultivos generan un ambiente hostil para esta microbiota (Rosas, 2004; Whipps et al., 2008). Debido a la persistencia que los microorganismos poseen para colonizar este tipo de hábitat, la superficie vegetal es un área donde pueden ocurrir transferencias horizontales de genes de resistencia a condiciones de estrés; generando diversificación microbiana en el ambiente (Rosas, 2004).

En condiciones ambientales desfavorables, cada tipo de microorganismo posee diferentes herramientas para su supervivencia. Las estrategias de adaptación son formas que los microorganismos poseen para aprovechar parte de la energía en reproducirse en el ambiente. Los microorganismos que ocupan la mayoría de su energía para la reproducción (estrategas r) y los microorganismos que ocupan su energía limitadamente para la asimilación y crecimiento de su población (estrategas K) están en constante interacción en el ecosistema donde habitan para mantener limitado y controlado el número de individuos en su hábitat (Belart, 2008). Existen también otras maneras de supervivencia, por ejemplo, las bacterias poseen un tiempo de reproducción mayor al de los demás microorganismos, las levaduras generan polisacáridos extracelulares y los hongos filamentosos producen esporas (Blakeman, 1985). En la superficie de hojas y frutos podemos encontrar una población alrededor de  $10^2$  y  $10^8$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de hongos filamentosos (Inacio, 2002).

La gran variedad de microflora presente en la filósfera sugiere la existencia de diferentes clases de microorganismos. Los epífitos comensales (no patógenos para el vegetal) son abundantes y su supervivencia en este hábitat es fácil, sin embargo, diferentes microorganismos saprófitos y patógenos logran colonizar de la misma forma superficies de hojas sanas. La filósfera comensal genera grandes beneficios a la planta, resultados que se visualizan en la salud del vegetal, promoción del crecimiento, calidad y mejora de los productos agrícolas, etc (Whipps et al., 2008). Al contrario, los microorganismos patógenos y algunos saprófitos generan daño en la superficie a través diferentes mecanismos propios de cada especie microbiana (producción de enzimas, producción de toxinas, desbalance en el sistema hormonal de crecimiento vegetal, virulencia genética), afectando fisiológicamente a la planta (Agrios, 2005).

Sin embargo no todas las poblaciones epífitas se encuentran en una concentración fija y estable. Los cambios climáticos (lluvias, viento, etc) al igual que los vectores (insectos, partículas de polvo) son factores que generan una constante distribución de microflora en el ambiente (Osono, 2008; Zak, 2002). La mayoría de microorganismos presentes en la atmósfera están asociados con partículas y su concentración en el exterior varía con la época del año. Por ejemplo, en las épocas secas los microorganismos asociados a partículas aumentan con la presencia de viento en el ambiente, generando una gran diversidad de microorganismos en la superficie de plantas, ya estén estas situadas cerca o lejos del origen (Rosas, 2004).

#### 2.2.3.2 *Microecosistema endófito*

Antiguamente se conocía a los microorganismos endófitos como mutualistas, es decir, aquellos organismos fúngicos que vivían asintóticamente en el interior del tejido vegetal vivo (Carroll, 1986). Según Wilson (1995), los endófitos fúngicos y bacterianos son microorganismos que invaden tejido vegetal vivo durante todo su ciclo de vida o la mayoría de este; provocando infecciones asintomáticas completamente dentro de los tejidos. Actualmente, el término endófito fúngico hace referencia a hongos que colonizan la planta sin causar síntomas, ni una enfermedad visible (Schulz y Boyle, 2005; Stone, Bacon y White, 2000). El *phylum*

Ascomycota posee la mayoría de miembros con características endófitas, pero también existen endófitos del *phylum* Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota (Gherbawy y Voigt, 2010; Huang, Wang, Zheng y Su, 2001; Rosa et al., 2011; Sánchez et al., 2013). Los hongos endófitos son clasificados en dos grupos de acuerdo a su evolución, taxonomía, planta hospedera y funciones ecológicas. Los clavicetáceos infectan tejido solamente de pasto y los no clavicetáceos se encuentran comúnmente en tejidos asintomáticos de briofitas, helechos, angiospermas y gimnospermas (Rodríguez, White, Arnold y Redman, 2009; Rosa et al., 2011; Sánchez et al., 2013). De este último grupo, la mayoría de géneros pertenecen al filo Ascomycota o Basidiomycota, encontrando con mayor frecuencia a *Alternaria*, *Arthrobotrys*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coprinellus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phoma*, etc. (Rosa et al., 2011).

Dentro del tejido de la planta pueden encontrarse diferentes tipos de endófitos. Los endófitos oportunistas, ligeramente patógenos, empiezan a generar síntomas cuando el tejido se encuentra en senescencia o existe alguna alteración dentro de la planta, y los endófitos simbioses ofrecen diferentes características benéficas y una actividad mutualista con el hospedero (Arnold, 2007; Hernández, 2001; Schurlz y Boyle, 2005).

Los hongos endófitos pueden convertirse en hongos saprofitos o, a su vez, patógenos cuando el entorno de la planta es deficiente o se encuentra en proceso de senescencia, con efectos negativos sobre la planta hospedante (Promputtha, Lumyong, Dhanasekaran, McKenzie, Hyde y Jeewon, 2007). El desarrollo de síntomas de una enfermedad en la planta se basa en tres parámetros: a) el ambiente, b) el hospedero, y c) el microorganismo. El ambiente son todas las condiciones que favorecen la enfermedad (lluvia, humedad, etc.), el hospedero hace referencia a las condiciones de susceptibilidad de la planta (mala nutrición, situaciones de estrés, genética, senescencia, etc.) y el microorganismo “endófito”, que se convierte en “patógeno”, cuando estos dos parámetros favorecen el desarrollo del mismo

produciendo enfermedad (Agrios, 2005; Rondón y Rodríguez, 2006; Schurlz y Boyle, 2005; Schulz, Rommert, Dammann, Aust y Strack, 1999).

Además, la especificidad tanto del endófito fúngico como del hospedero juega un rol importante entre ambos. Un microorganismo endófito puede actuar como patógeno en una especie de huésped, mientras que en otra especie puede ser simplemente un microorganismo comensal (Agrios, 2005; Redman, Dunigan y Rodríguez, 2001). Esta susceptibilidad por parte de la planta beneficia a algunos endófitos oportunistas al acelerar su reproducción y posterior colonización del tejido, causando efectos negativos en su hospedero (Agrios, 2005; Douanla-Meli et al., 2013).

En cambio, los endófitos también generan mejora fisiológica y funcional del hospedero, por ejemplo, la tolerancia a factores de estrés provenientes del medio ambiente como las altas temperaturas, sequías o la capacidad de sobrellevar la deficiencia de nutrientes provenientes del suelo, etc. Los hongos endófitos protegen a su hospedero contra factores abióticos y bióticos aplicando tres mecanismos: a) producción directa por parte del hongo de enzimas y/o metabolitos secundarios anti-patógeno, b) inducción e incremento de la expresión de los mecanismos de defensa propios de la planta (defensa fisiológica y/o química) y c) ocupación del nicho ecológico (Douanla-Meli et al., 2013; Gao, Dai y Liu, 2010; Herre et al., 2007; Sánchez et al., 2013).

La relación entre el hongo endófito y la planta es una relación antagonista balanceada. Por un lado, el hongo endófito produce diferentes factores de virulencia (metabolitos, exoenzimas, etc.). Por su parte, la planta posee diferentes mecanismos de defensa (mecánicos y/o bioquímicos). Así se generan un “antagonismo balanceado” y un equilibrio en la relación endofítica entre ambos organismos (Sánchez et al., 2013).

## 2.2.4 Biodiversidad de hongos endófitos y epífitos en el mundo

Alrededor del mundo, diferentes estudios se han realizado con el objeto de identificar la diversidad de hongos endófitos y epífitos sobre diversos cultivos (Alvindhia y Natsuaki, 2008; Douanla-Meli et al., 2013 Khan et al., 2007; Kharwar et al., 2010; Kumar y Hyde, 2004; Palou et al., 2001; Salas, 2010; Santamaría y Bayman, 2005). En particular, los estudios se han centrado en identificar la micoflora tanto endófito como epífita de muestras asintomáticas y sintomáticas de varias plantas (Douanla-Meli et al., 2013; Kharwar et al., 2010; Salas, 2010). En cultivos frutales como el limón blanco, *Citrus reticulata*, se encontró una alta frecuencia de hongos como *Cladosporium* sp. y *Penicillium* sp. en la zona de Tarragona, España (Palou et al., 2001). En otra especie, *Citrus limon*, se registró con mayor frecuencia a *Mycosphaerellaceous* sp. en hojas sanas, mientras que *Colletotrichum gloeosporoides* estuvo presente en hojas enfermas de Yaoundé, Camerún (Douanla-Meli et al., 2013). Estudios en China se han centrado en la biodiversidad endófito presente en hojas, tallos y raíces asintomáticos de plantas medicinales de esta región. (Huang, Cai, Hyde, Corke y Sun, 2008; Kumar y Hyde, 2004). Tejidos de *Tripterygium wilfordii* fueron evaluados para definir la biodiversidad y recurrencia de hongos endófitos; como resultado, las especies fúngicas cosmopolitas *Colletotrichum gloeosporioides*, *Guignardia* sp., *Glomerella cingulata*, *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp. y *Phyllosticta* sp. estuvieron presentes en la mencionada planta (Kumar y Hyde, 2004). Además, un total de 29 especies de plantas medicinales, excluyendo la antes mencionada, fueron evaluadas para observar la biodiversidad fúngica presente y su recurrencia en el tejido. Los géneros *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Alternaria*, *Phoma* y *Xylariales* fueron los más frecuentes, mientras que ejemplos de especies y géneros infrecuentes fueron *Aureobasidium pullulans*, *Botryosphaeria*, *Coelomyces*, *Drechslera*, *Ellisembia*, *Ephelis*, *Flagellospora*, *Helminthosporium*, etc. (Huang et al., 2008).

En plantas de interés comercial como el banano se realizó un estudio de epífitos del fruto en donde se reportó la presencia de hongos como *Thielaviopsis paradoxa*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium verticillioides*, *Clonostachys byssicola*, *Curvularia pallescens*, *Penicillium oxalicum* y *Trichoderma harzianum* (Alvindhia y Natsuaki, 2008). Por otro lado, Santamaría y Bayman (2005) evaluaron hojas asintomáticas de cultivos de café, *Coffea arabica*, en Puerto Rico. Los géneros más comunes fueron *Pestalotia* sp. y *Botryosphaeria*

sp. como hongos epífitos y como hongos endófitos *Colletotrichum* sp., *Xylaria* sp. y *Guignardia* sp. En la India, se han realizado estudios sobre la diversidad fúngica tanto endófito como epífita en cultivos de interés comercial y medicinal (Khan et al., 2007; Kharwar et al., 2010). En el algodón de seda, *Calotropis procera*, los autores identificaron hongos endófitos como *Aspergillus* sp. *A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium sublateritium*, *Phoma* sp., *P. chrysanthemicola*, *P. hedericola* y *Candida albicans* (Khan et al., 2007). En la superficie de hojas sanas de *Eucalyptus citriodora* Hook, eucalipto aromático medicinal, encontraron una predominancia de *Cladosporium cladosporioides*; mientras que, *Botrytis cinerea* fue mayormente encontrado en el tejido foliar (Kharwar et al., 2010). El interés principal de los estudios sobre biodiversidad fúngica es encontrar potenciales hongos endófitos y epífitos con actividades inhibitorias contra diferentes microorganismos y/o plagas (Alvindhia y Natsuaki, 2008; Kharwar et al., 2010; Kumar y Hyde, 2004; Santamaría y Bayman, 2005).

A nivel de Latinoamérica, los estudios sobre diversidad endófito y epífita son escasos. Salas (2010) identificó la predominancia tanto endófito como epífita de *Cladosporium* sp. en hojas de café asintomáticas y sintomáticas de la enfermedad “Ojo de Gallo” en dos zonas de Costa Rica. Además, el estudio de Rondón y Rodríguez (2006) sobre hojas y frutos del mango “Haden”, *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae), demostró que microorganismos fitopatógenos se hallan comúnmente de manera asintomática dentro de tejidos sanos. Se registró la presencia de *Fusarium decemcellulare*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Alternaria alternata*, *Phomopsis mangiferae*, *Pestalotiopsis* sp. y *Cladosporium* sp. en órganos de mango en Maracaibo, Venezuela.

En Ecuador, los estudios en este ámbito son pocos y se han enfocado a aspectos clínicos y agrícolas. A nivel clínico, Ramírez et al. (2006) fijó su investigación en identificar endófitos de plantas medicinales. Como resultado encontró hongos como *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp., *Nigrospora* sp. y *Phoma* sp. A nivel agrícola, Delgado, Rodolfi, Vásquez e Icaza (2009) clasificaron taxonómicamente los hongos endófitos provenientes de plantas de páramo, *Chuquiragua jussieui* (J.F) y *Bidens andicola* Kunth. *varandicola*. En *C. jussieui* se identificaron los siguientes hongos *Cladosporium* spp., *Coelomycetes*, *Fusarium* spp., *Nigrospora* sp., y *Phoma* spp.; mientras que, en *B.*

*andicola* Kunth. se identificaron *Alternaria* sp., *Cladosporium* spp., *Coelomyces*, *Fusarium* spp. y *Nigrospora* sp. En cultivos como tomate, banano y sandía se reportó la presencia de sus principales fitopatógenos como *Alternaria alternata*, *F. oxysporum*, *Botrytis* sp y *Mycosphaerella fijiensis*, mientras que se obtuvo como hongos epífitos a *Mucor* sp., *Curvularia lunata* y *Penicillium* sp. (Espinoza et al., 2009). Finalmente, lesiones necróticas presentes en *Phaseolus vulgaris* L. mostraron la presencia de géneros de hongos endófitos como *Alternaria*, *Fusarium*, *Boeremia*, *Phoma*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, etc. (Cornejo, 2014).

### **2.2.5 Análisis de patrones de biodiversidad**

La biodiversidad comprende el análisis de la riqueza de especies específicas de un lugar concreto y la evolución biológica dominante sufrida. Además se fija en la importancia de alguna de ellas en relación al ámbito farmacológico, agrícola, o ecológico generando información para aplicaciones en el futuro. La biodiversidad puede ser medida mediante indicadores biológicos presentes en el ecosistema estudiado como también por índices (cálculos matemáticos) más complejos que nos ayudarán a conocer la situación actual y a través del tiempo del mismo ecosistema. La biodiversidad existente en una comunidad se divide en diversidad alfa, beta y gamma (Escolástico, Cabildo, Claramut y Claramut, 2013). La diversidad alfa hace referencia a la riqueza de especies en una comunidad determinada, mientras que la diversidad beta se refiere al cambio en la composición de las especies entre comunidades. Si el área es más extensa, la diversidad gamma analiza la riqueza total de las comunidades, es decir, es la suma de la diversidad alfa encontrada en todas las pequeñas zonas del área mayor (Villareal et al, 2004).

#### *2.2.5.1 Diversidad Alfa*

Esta diversidad es analizada basándose en a) la riqueza de la muestra (palabra usada para referirse al sitio muestreado) y b) por la estructura (especies) de la muestra.

**a) Diversidad alfa relacionado con la riqueza específica**

Para medir la diversidad alfa de acuerdo a la riqueza existente se utiliza varios índices directos, curvas de acumulación de especies y los métodos no paramétricos. Los índices directos comprenden cálculos como la riqueza de especies, el índice de Margalef, la Rarefacción, el índice de Coleman y el de Michaelis-Menten. Las curvas de acumulación de especies son utilizadas para tasar el número de especies posibles a encontrar a partir del muestreo realizado. La curva puede ser usada con un modelo lineal (distribución estadística/ matemática conocida). En cambio, un método no paramétrico es usado cuando no se conoce la distribución estadística o no concuerda con ningún modelo determinado (Villareal, 2004).

La Riqueza específica ( $S$ ) es el número total ( $N$ ) de especies presentes en un grupo (muestra) (Escolástico et al., 2013; Magurran y McGill, 2011). El Índice de Margalef ( $D_{Mg}$ ) realiza una comparación entre el número de especie y el número total de individuos del sitio del muestreo (Escolástico et al., 2013; Magurran y McGill, 2011; Villareal, 2004). Estos datos exponen una relación armónica entre el número de especies y el número total de individuos; si esto no sucede el índice varía con el tamaño de la muestra obtenida (Escolástico et al., 2013).

**b) Diversidad alfa relacionada con la estructura de la comunidad**

El análisis de la diversidad alfa de acuerdo a cómo se encuentra estructurada su comunidad, comprende la relación de la abundancia de especies en la muestra. Para esto tenemos los índices de abundancia proporcional, los modelos paramétricos y los modelos no paramétricos. Dentro de los índices de abundancia proporcional se analizan los índices de dominancia (índice de Simpson y la serie de Hill) y de equidad (índice de Shannon-Wiener, Pielou y Brillouin). El primero toma en cuenta solamente la especie dominante mientras que el segundo hace énfasis en la abundancia de cada especie y si esta se presenta distribuida uniformemente dentro de la muestra (Villareal, 2004).

El Índice de Simpson ( $D$ ) nos muestra la dominancia de una especie en la muestra. Genera una probabilidad, en donde, al realizar un muestreo al azar, los dos

individuos seleccionados deberán pertenecer a la misma especie (Escolástico et al, 2013; Marcial et al., 2012; Villareal, 2004). El Índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ) trata de mostrar la uniformidad presente en la muestra. Este dato considera que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies estarán representadas en la muestra (Escolástico et al, 2013; Marcial et al., 2012; Villareal, 2004).

#### *2.2.5.2 Diversidad Beta*

Esta diversidad nos indica la similitud de dos muestras. Existen dos clases de métodos para cuantificar la diversidad beta: de similitud/disimilitud y los de recambio/reemplazo de especies. El primer método expresa el grado de semejanza/abundancia de especies entre dos muestras, mientras que el segundo método expresa el grado de complementariedad de composiciones entre muestras. El método de similitud/disimilitud posee métodos cualitativos (Coeficiente de similitud de Jaccard e Índice de Sorensen) y métodos cuantitativos (Índice de Sorensen cuantitativo e Índice de Morisita-Horn). El método cualitativo compara las especies dentro de dos muestras y expresa la semejanza que existe entre éstas. El índice de Jaccard mide diferencias entre la presencia o ausencia de especies, es decir, relaciona las especies compartidas con la totalidad de exclusivas (Escolástico et al., 2013; Villareal, 2004).

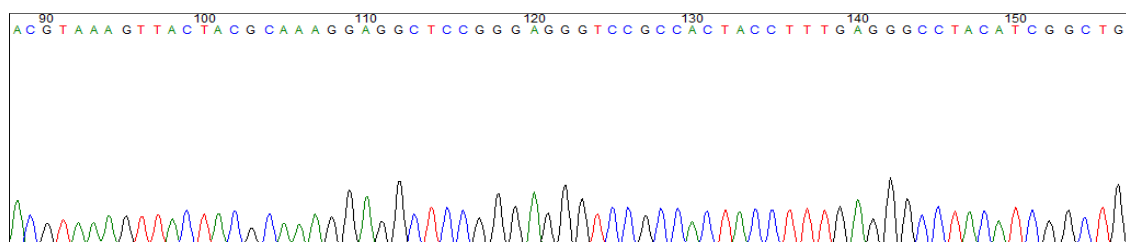
### **2.3. GENÓMICA**

La genómica es una parte de la genética que estudia la organización molecular del genoma. Esta ciencia conlleva el análisis de todo el genoma (eucariota y procariota) de los organismos vivientes, para conocer la organización, evolución y función de los genes que lo constituyen. La genómica se divide en tres componentes: a) genómica estructural, que está directamente relacionada con la secuenciación y mapeo de cada uno de los genes del ácido desoxirribonucleico (ADN), b) genómica funcional, que engloba el estudio de las funciones de cada gen que conforma el genoma, y c) genómica comparativa, la cual estudia y compara el genoma entre diferentes organismos con el objetivo de encontrar similitudes o establecer la relación evolutiva (Patnaik, 2012).

Las herramientas y métodos usados por la genómica muestran la manipulación y el contacto prolongado con técnicas moleculares que nos ayuden al análisis del genoma de diferentes organismos. Una de las técnicas en el estudio de la genómica de microorganismos es la secuenciación de ADN, ya sea este el genoma completo de un microorganismo o fracciones del genoma característicos de un género o especie (Patnaik, 2012; Xu, 2006). Hablando del ámbito de laboratorio, la “Reacción en cadena de la polimerasa” (PCR por sus siglas en inglés) es una de las técnicas en esta área que amplifica y analiza cantidades pequeñas de ADN provenientes de laboratorio o del medio ambiente. A su vez, esta última técnica puede ser usada posteriormente en combinación con otras técnicas de laboratorio que manejen ADN para generar un estudio enfocado en una forma diferente (Xu, 2006).

### 2.3.1 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN (Sanger et al., 1977) es una técnica molecular que permite saber el orden exacto de los nucleótidos y sus respectivas bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina). Actualmente, la secuenciación se ha enfocado en automatizar estos procesos con el fin de acelerar el tiempo demandado y a su vez extender el número de bases leídas por cada corrida. Estos sistemas automatizados están basados en el método enzimático usando compuestos fluorescentes o radioactivos sobre las cuatro bases nitrogenadas o sobre el cebador (Zavala, 2005). Las secuencias obtenidas son mostradas por cromatogramas, y posteriormente deberán ser incluidas en alguna base de datos o analizadas en base a estas.



**Figura 2. Cromatograma obtenido tras la secuenciación de la región ITS1-5.8S, rRNA-ITS2 de uno de los hongos aislados de *Citrus sinensis* y visualizado en el programa Mega 6.**

### **2.3.2 Bioinformática**

Actualmente, se ha secuenciado el genoma completo de varios organismos como insectos, bacterias, hongos, pequeñas especies hasta del ser humano. La secuenciación de ADN de varias especies se ha incrementado enormemente, lo que demandó la creación de bases de datos donde se pueda almacenar, organizar e indexar la información obtenida. La bioinformática es una ciencia computarizada. Esta disciplina está a cargo de la adquisición, almacenamiento, acceso de datos referentes a ADN y/o proteínas. La base de datos que la bioinformática maneja es un repositorio o una colección de secuencias (ADN o aminoácidos). Refiriéndose al área de la ciencia, la base de datos posee tres objetivos principales: tener a disposición todos los datos relevantes en un solo lugar, actualizar la información fácilmente, y tener un fácil almacenamiento y recuperación de información relevante (Patnaik, 2012). Electrónicamente, existen muchos repositorios donde se puede hallar la información del genoma que se busca (anexo 4). La base de datos facilita a los investigadores la búsqueda o la obtención de un patrón con el cual comparar las secuencias obtenidas. Es de gran utilidad para identificar géneros, especies, relaciones filogenéticas, etc. (Prats, 2006).

### **2.3.3 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

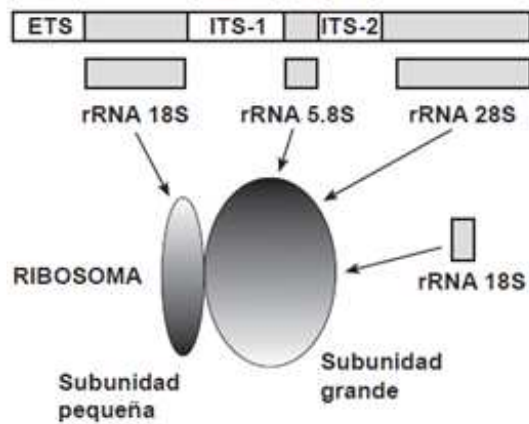
La PCR es una técnica molecular usada con el objetivo de replicar muchas veces un fragmento específico de ácido desoxirribonucleico en poco tiempo. Consta de tres etapas, las cuales producen cambios de temperatura seguidos de varias repeticiones consecutivas de los ciclos configurados en el termociclador. La primera fase es la denaturación que se lleva a cabo a temperaturas entre 93 °C a 97 °C. Estas altas temperaturas hacen que los enlaces de hidrógeno de la doble hélice de ácido desoxirribonucleico (ADN) se rompan generando dos hebras. La segunda fase conocida como hibridación ocurre entre 50°C-65°C en donde los cebadores (*primers*) se unen a sus zonas complementarias para posteriormente amplificarlas. La tercera etapa es la elongación que se da a una temperatura de 72 °C en donde la Taq polimerasa añade dNTPs para crear una cadena sencilla de ADN complementaria al sitio blanco. Como resultado de cada ciclo se origina un fragmento de ADN de doble cadena (Prats, 2006; Schuller, Carter, James, Halliday y Slots, 2010). Los

fragmentos obtenidos gracias a la especificidad del cebador se denominan amplicones. Los amplicones o “productos de la PCR” pueden ser detectados y analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa. Este método de detección determina la presencia del amplicón y, al mismo tiempo, su tamaño en función de fragmentos de ADN con diferentes pesos moleculares (*ladder*) (Prats, 2006; van Pelt Verkuil, van Belkum y Hays, 2008). Todas las bandas son reveladas mediante la tinción de ADN con colorantes como el bromuro de etidio o el *SYBR Green*. Estos químicos se insertan o intercalan entre las hebras del fragmento de ADN y la fluorescencia es detectada en un ambiente oscuro expuesto a luz ultravioleta (van Pelt Verkuil et al., 2008).

Los cebadores más utilizados cuando se trata de microorganismos fúngicos, son secuencias de nucleótidos que actúan sobre la región del ADN llamada espaciador transcrito interno (ITS por sus siglas en inglés) (Sánchez, 2009; Soriano del Castillo, 2007). Los ITS comúnmente usados en diferentes investigaciones fúngicas son: ITS 1 (5'TCCGTAGGTGAACCCTGCGG3'), ITS 2 (5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC3'), ITS 5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3') y el ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (Camarena, 2012).

#### 2.3.3.1 Espaciador Transcrito Interno

El ADN ribosómico (ADNr) es una secuencia de ADN que posee dos subunidades de genoma fúngico. La subunidad pequeña que contiene al gen 18S rRNA y al gen 5.8S rRNA y la subunidad grande que presenta el gen 28S rRNA (figura 3). El ADNr se caracteriza por su nivel bajo de polimorfismo constituyendo los genes más conservados del genoma (Camarena, 2012; Crous, Verkley, Groenewald y Samson, 2009). Entre los genes ribosomales del ADNr se encuentran segmentos espaciadores transcritos y no transcritos. Los espaciadores transcritos internos (ITS 1 e ITS2) se encuentran entre la subunidad pequeña y el gen 5.8S rRNA y la subunidad grande que presenta el gen 28S rRNA respectivamente (figura 3). Estas son regiones con pocas homologías, ya que no forman parte del ARN estructural (Camarena, 2012), y presentan una alta tasa de evolución, lo que los hace marcadores adecuados para la filogenia a nivel de especie (Camarena, 2012; Crous et al., 2009).



**Figura 3.** Subunidades del genoma fúngico, genes ribosomales y espaciadores transcritos internos (ITS 1 e ITS2). Por Camarena, 2012, *Revista Chapingo*, 18 (3), p. 418.

### 2.3.4 Análisis filogenético

La filogenética es el estudio de la filogenia (del griego phylon: “tribu, raza” y genea; “nacimiento, origen, procedencia”). La filogenética estudia la evolución de un organismo y/o de las relaciones ancestrales entre los organismos de un grupo, proporcionando conocimientos sobre las relaciones filogenéticas entre diferentes grupos analizados y su evolución en el tiempo (Contreras, Cuevas, Goyenechea y Iturbe, 2007; Oren y Papke, 2010). Antiguamente, la filogenética tradicional basada en fenotipos (características morfológicas y fisiológicas) era suficiente para clasificar a los diferentes microorganismos. Debido a la alta variación de características entre taxos relacionados, esta filogenética dejó de ser una herramienta principal, pasando a ser el análisis de genes y genomas (filogenética molecular) la nueva herramienta actualmente usada. La filogenética molecular basada en secuencias típicas de ADN y su ubicación en los cromosomas es usada mayormente en secuencias procariontas y fúngicas. Un árbol filogenético es el resultado de un análisis filogenético, una gráfica donde se evidencia la relación evolutiva de organismos que formaron dicho árbol (Oren y Papke, 2010).

Para el análisis de la filogenia existen varias técnicas: métodos de distancia y métodos con datos de carácter discreto (Miyamoto y Cracraft, 1991). Los métodos de distancia como el método de evolución mínima, *Neighbor-Joining*, generan árboles donde se adaptan, en pareja” según sus secuencias, a una matriz de distancias evolutivas (Miyamoto y Cracraft, 1991; Oren y Papke, 2010). Los métodos de carácter discreto como el método basados en la máxima parsimonia, o en el máximo probabilístico, métodos bayesiano usan las secuencias directamente, y únicamente los dos últimos se basan en modelo evolutivo explícito (Oren y Papke, 2010).

#### 2.3.4.1 Método *Neighbor- Joining* (NJ)

El método de análisis filogenético *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987) pertenece al estudio de métodos de distancia, donde se analiza los diferentes linajes que comprenden un grupo en estudio. Estos linajes específicamente no necesitan divergir en cantidades equitativas, es decir, que el método permite reconstruir información con datos distantes. Es el método más rápido pues ocupa algoritmos y analiza largos sets de datos (Miyamoto y Cracraft, 1991; Oren y Papke, 2010) y genera un dendograma donde se muestra únicamente el grado de similitud de las secuencias, es decir reflejará la similitud entre las especies presentes mas no una relación ancestro- evolutiva (Oren y Papke, 2010; Peña, 2011).

Para el análisis estadístico de los resultados que genera NJ se utiliza el método de *Bootstrap*, forma de evaluación estándar para el análisis de la hipótesis parcial generada en el árbol filogenético (Kurtzman y Fell, 2011).

#### 2.3.4.2 *Bootstrap*

Basándose en la matriz original (con muestreos aleatorios), este análisis estadístico reacomoda los caracteres de la matriz primaria generando  $n$  número de matrices. Cada matriz adquiere uno o varios árboles. Los árboles más cortos son escogidos para obtener un árbol concenso (Solanas y Sierra, 1992). Según D´Elía (2014), las proporciones de *Bootstrap* son las medidas de apoyo o soporte de cada clado. Las proporciones dan un soporte estadístico. Estas pueden variar entre 50 y 100 % en

donde un valor mayor muestra mayor soporte, mientras que un valor bajo es interpretado como poseedor de un bajo soporte mas no como indicador de un clado falso.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Tipo de estudio y Técnica de muestreo

El presente estudio fue parte del proyecto “Colección e inventario de hongos microscópicos causantes de enfermedades en cultivos de importancia comercial (fitopatógenos) en la región Litoral del Ecuador”, código K13190. Financiado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), en el año 2014.

Esta investigación fue de tipo descriptivo-transversal. Un total de 60 naranjas fueron recolectadas de tres árboles de naranjo en Quevedo-Los Ríos (S01° 0.463' / W079°29.407') y de tres árboles de El Empalme-Guayas (S01°06.1101' / W79°39.104'). De las 30 naranjas de cada localidad, 20 naranjas con presencia de lesiones similares a sarna (figura 4) y 10 sin lesiones aparentes. Un total de 36 hojas sin lesiones (anexo 6) fueron recolectadas, 18 hojas en Quevedo-Los Ríos y 18 hojas en El Empalme-Guayas provenientes de los tres árboles muestreados en cada lugar.

#### 3.2 Equipos y materiales

##### 3.2.1 Materiales usados en el estudio

###### 3.2.1.1 *Materiales de campo*

- *Cooler.*
- Fundas de papel.
- Guantes de látex.
- GPS.
- *Icepack.*
- Marcadores permanentes.
- Papel absorbente.
- Tijera podadora.

### 3.2.1.2 Materiales de laboratorio para cultivo de hongos

- Agar Papa Dextrosa (APD) 500g.
- Agua destilada estéril.
- Agua peptonada.
- Alcohol etílico (70%).
- Alcohol etílico (96%).
- Asa de *Drigalsky*.
- Cajas Petri de 15 mm.
- Cajas Petri de 60 mm.
- Contenedor plástico de color claro.
- Fundas plásticas herméticas tamaño mediano, Ziploc®.
- Guantes.
- Hipoclorito de sodio (3.5%).
- Juego de tijeras y bisturí.
- Marcadores permanentes.
- *Parafilm*.
- Puntas desechables para pipeta 100 µl, AXYGEN.
- Microtubos vol. 1.5 ml, AXYGEN.

### 3.2.1.3 Materiales de laboratorio para extracción y análisis de ADN

- Agua libre de nucleasas, PROMEGA, LOT 0000068977.
- Agarosa 500 gr. (Ultra-pura), INVITROGEN.
- Alcohol antiséptico 70%.
- *Blue/Orange 6X Loading Dye*, PROMEGA.
- *Buffer TAE 10X*, PROMEGA.
- Cebadores Universales (ITS4, ITS5), INVITROGEN.
- *DNA Ladder 100pb*, PROMEGA.
- *DNA SYBR® Safe Gel stain*, INVITROGEN.
- *Go Taq® GreenMaster Mix*, PROMEGA.
- Guantes de nitrilo.

- Microtubos PCR vol. 0.2 ml, AXYGEN.
- Puntas desechables para pipeta 0,1- 10µl, AXYGEN.
- Puntas desechables para pipeta 100 µl, AXYGEN.
- Puntas desechables para pipeta 1000 µl, AXYGEN.
- Microtubos vol. 1.5 ml, AXYGEN.
- *Wizard® Genomic DNA Purification*, PROMEGA.

### 3.2.2 Equipos usados en el estudio

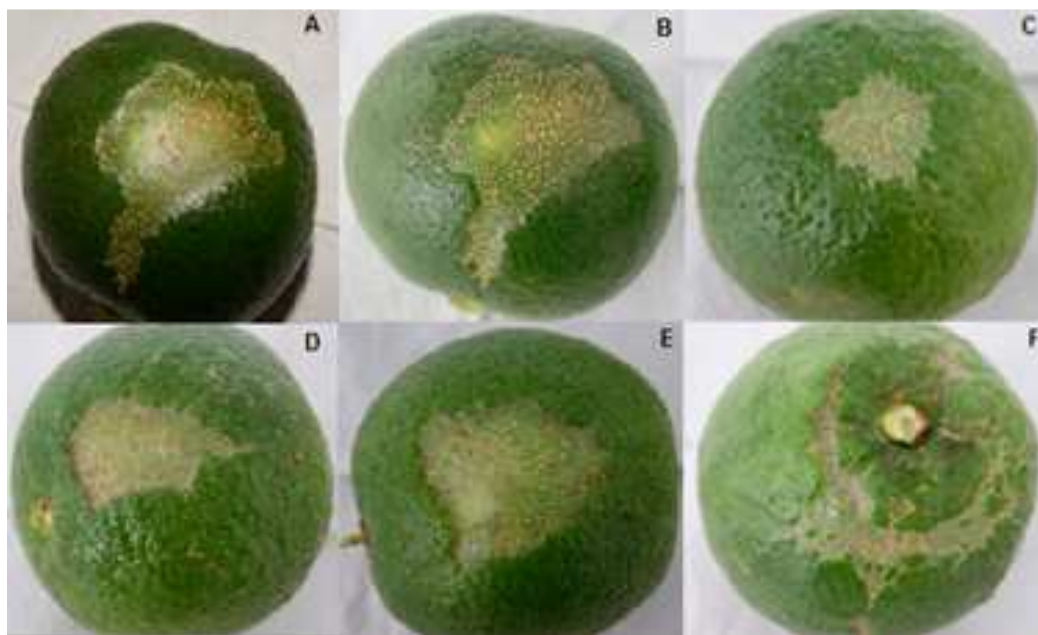
- Autoclave, Market-Forgot.
- Cámara electroforética horizontal, C.B.S SCIENTIFIC, modelo: MGU-501T, serie: 006918
- Fuente de poder C.B.S Scientific
- Cámara fotográfica, NOKIA, modelo: Lumia 900
- Microcentrífuga, PRISM-LABNET, modelo: C-2500, Ref. G-6600, serie: P-101004.
- Micro-incubadora LABNET, modelo: I-5110, Ref.NJ07095, serie: 06091109.
- Microondas Panasonic.
- Espectrofotómetro NanoDrop2000, ThermoScientific.
- Pipetas automáticas de volumen variable, LABNET.
- Termobloque DRY-BATH, modelo: DB-005, serie: 919622.
- Termociclador, LABNET, modelo: MULTIGENE OPTIMAX: Ref.TC-9610, serie:1202020
- Transiluminador con luz ultravioleta, INVITROGEN SafeImager™ 2.0, modelo: BLUE-LIGHT TRANS-ILUMINADOR, serie: 13110317

## 3.3 Métodos

### 3.3.1. Recolección y traslado de muestras

Las muestras fueron recolectadas de dos localidades de la región del litoral ecuatoriano, Quevedo-Los Ríos y El Empalme-Guayas. Se realizó un muestreo estratificado al azar, pues se buscó frutos con lesiones, frutos sin lesiones, y hojas sanas. Cada muestra

recolectada fue georeferenciada y colocada en funda *Ziploc*® individual. Las muestras fueron colocadas en un *cooler* con pilas de *icepack*, y trasladadas vía terrestre a los laboratorios de Micología e Investigación de la Escuela de Bioanálisis de la PUCE, Quito, para el análisis microbiológico y su posterior análisis molecular respectivamente.



**Figura 4.** Naranjas con lesiones superficiales provenientes de Quevedo-Los Ríos (A, B, C). Naranjas con lesiones superficiales provenientes de El Empalme-Guayas (D, E, F).

### 3.3.2 Aislamiento de hongos epífitos

Para el aislamiento de los microorganismos epífitos, las 30 naranjas recolectadas se procesaron individualmente mientras que las 36 hojas se procesaron en conjunto de acuerdo al árbol muestreado generando resultados que representan la localidad. Las naranjas se lavaron de forma individual dentro de fundas *Ziploc*® con 90 ml de agua peptonada y se las agitó manualmente por 3 minutos. Las hojas fueron lavadas en conjunto (como un *pool*) con el mismo tiempo de agitación. Concluido el proceso se realizaron dos diluciones seriadas, para lo cual se tomaron 100  $\mu$ l de la solución producto del lavado y se los colocó en un microtubo junto con 900  $\mu$ l de agua destilada estéril. Esa muestra constituyó la dilución  $10^{-1}$ , la misma que fue agitada mediante inversión por tres ocasiones. En otro microtubo con 900  $\mu$ l de agua peptonada se adicionaron 100  $\mu$ l de la dilución  $10^{-1}$ . Esa

muestra constituyó la dilución  $10^{-2}$ . Una vez realizadas las diluciones, se inoculó un volumen de 1 ml de cada una ( $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) sobre cajas Petri con medio APD. Se aplicó el método de siembra en superficie, que consiste en esparcir el inóculo con un asa de *Drigalsky*. Tras la siembra, las cajas fueron selladas con *parafilm* y dispuestas en un contenedor plástico transparente para el ingreso de luz ambiental. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por un período aproximado de una semana con revisión diaria (Salas, 2010). Se realizaron controles de esterilidad del agua peptonada, del APD y de las fundas *Ziploc*® antes de ser utilizadas.

### **3.3.3 Aislamiento de hongos endófitos**

Para el aislamiento de hongos endófitos se aplicó el procedimiento realizado por Douanla-Meli et al. (2013). Las naranjas que presentaron lesiones superficiales se sumergieron individualmente en alcohol al 96% por un minuto, seguido de hipoclorito al 3.5% por cinco minutos y finalmente en alcohol (96%) por 30 segundos. Para retirar el exceso de sustancias químicas, se enjuagaron las muestras por inmersión en agua destilada estéril. Para la siembra, se cortó el tejido lesionado y el tejido sano adjunto de cada naranja con un bisturí estéril. El corte se colocó directamente en la superficie del medio APD en caja Petri. Las cajas fueron selladas con *parafilm* y colocadas en un contenedor plástico. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por una semana. Se realizaron controles de esterilidad del agua destilada estéril y del APD antes de ser usados en el proceso. Para garantizar la desinfección total de las muestras se inoculó 1 ml del agua de enjuague final en APD mediante técnica de profundidad. Se verificó la ausencia de crecimiento alguno tras siete días de incubación.

### **3.3.4 Obtención de cultivos puros**

Se realizaron cultivos puros de los hongos obtenidos en los aislamientos anteriores (figura 8). Con un bisturí estéril se cortó un pedazo pequeño de agar que contenía el hongo en crecimiento. Este pedazo se inoculó en una caja Petri con APD. Se incubó a temperatura ambiente (23 °C) por un período aproximado de una semana. Durante el proceso de inoculación se mantuvo un ambiente aséptico usando dos mecheros.

### 3.3.5 Extracción de ADN de hongos aislados

El ADN genómico se extrajo del micelio del hongo en crecimiento. Este procedimiento se llevó a cabo mediante el uso del *kit* de extracción de ADN, *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega) y el protocolo el aislamiento de ADN genómico de tejido vegetal recomendado por el fabricante (Promega, 2010) (anexo 7).



**Figura 5.** Proceso de extracción de ADN fúngico. Laboratorio de Investigaciones de la Escuela de Bioanálisis. PUCE, Quito.

### 3.3.6 Cuantificación de ADN

Para cuantificar la calidad del ADN almacenado se utilizó el espectrofotómetro NANODROP 2000 (Thermo SCIENTIFIC) siguiendo las especificaciones del fabricante (anexo 8). El mismo proceso se realizó con cada una de las muestras de ADN a excepción del blanqueamiento que se realizó cada 10 muestras analizadas.

### 3.3.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Este procedimiento se siguió en base al protocolo propuesto por Crous et.al (2009) con modificaciones. Primero se elaboró la solución *Master Mix* sin ADN. Para obtener esta solución, en un microtubo de 1,5 ml se mezcló en este orden, 1 µl de *Primer forward Invitrogen* (ITS5), 1 µl de *Primer reverse Invitrogen* (ITS4), 8,5µl de agua ultrapura (Promega) y 12,5 µl de *GoTaqMix* 1X (Promega) quedando un volumen final de 23 µl *Master Mix* sin ADN por reacción. Después, se rotuló para cada muestra de ADN un microtubo de 0,2 ml en el cual se pipetearon 2 µl del ADN correspondiente, se añadieron 23 µl de la solución antes preparada y se resuspendió tres veces cada mezcla. En todo este proceso se mantuvo la cadena de frío. Al finalizar la preparación del *Master Mix* con ADN, se procedió a programar los ciclos para la PCR en el termociclador LabNet MULTIGENE OPTIMAX.

Las condiciones del termociclador para la PCR se detallan en la tabla 1.

**Tabla 1**

*Protocolo estandarizado para la amplificación de la región ITS del ADN de hongos*

<b>Protocolo para la amplificación de región ITS del ADN</b>			
Denaturación inicial	95°C	3 minutos	1 ciclo
Denaturación	94°C	30 segundos	35 ciclos
Hibridación	57°C	40 segundos	
Elongación	72°C	1 minuto	
Elongación final	72°C	5 minutos	1 ciclo

Los productos de PCR resultantes se refrigeraron a 8°C y para el control de calidad del procedimiento se añadió un control positivo y un control negativo para demostrar el correcto funcionamiento de la mezcla *Master Mix* usada. Para la comprobación de existencia y calidad del producto de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con los productos de PCR teñidos con 3 µl de *DNA SYBR® Safe Gel stain*. La corrida de la electroforesis fue realizada en una cámara horizontal por 30 minutos a 90 voltios en

condiciones específicas del equipo (C.B.S Scientific). El resultado se observó en un transiluminador (Invitrogen SafeImager™ 2.0) (anexo 9).

### 3.3.8 Secuenciación de ADN

Los productos de PCR se enviaron para su respectiva secuenciación a MACROGEN, Seúl-Corea del Sur. Las secuencias recibidas de MACROGEN fueron editadas y alineadas manualmente con el programa MEGA 6 (Tamura, Stecher, Peterson y Kumar, 2014). Se alinearon las secuencias de los *primers forward* y *reverse* para obtener la secuencia consensus mediante la opción Clustal W del mismo programa (anexo 10). Para la identificación de las especies se utilizó la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), que compara la identidad de las secuencias de estudio con secuencias disponibles en la base de datos del Banco de Genes (*GenBank-NCBI*). La mayoría de especies obtenidas mediante la búsqueda en BLAST estuvieron basadas en un 98% de similitud con los datos del *GenBank* (tabla 2 y 3).

### 3.3.9 Análisis de Patrones de Biodiversidad

Los patrones de biodiversidad fueron evaluados mediante los siguientes índices y sus respectivas fórmulas:

- Riqueza específica (S)

Número total (N) de especies presentes en un grupo.

- Índice de Margalef ( $D_{Mg}$ )

$D_{Mg} = S - 1 / \ln N$ , donde S es el número total de especies y  $\ln N$  es el logaritmo del total de individuos (Escolástico et al., 2013; Magurran y McGill, 2011).

- Índice de Simpson (D)

$D = \sum p_i^2$ , donde  $p_i$  representa la abundancia proporcional de la especie i, consiguiendo este valor con el número de individuos de una especie dividido para el número total de individuos de la muestra (Escolástico et al, 2013; Marcial, 2012; Villareal, 2004).

- Índice de Shannon-Wiener ( $H'$ )

$H' = -\sum p_i \ln p_i$ , en donde  $p_i$  es el resultado de la división del número de individuos de la especie y el número total de individuos de la muestra. Esta ecuación puede generar un valor de 0 o cercano a esta cifra cuando hay una sola especie, mientras que valores superiores a 1 indican una alta heterogeneidad de la muestra (Escolástico et al, 2013; Marcial et al, 2012; Villareal, 2004).

- Coeficiente de similitud de Jaccard ( $I_j$ )

$I_j = \frac{c}{a+b-c}$ , donde a representa el número de especies en el sitio 1, b es el número de especies del sitio 2 y c es el número de especies compartidas entre los dos sitios (1 y 2). Los resultados varían entre 0 y 1, el valor más alto se genera cuando los dos sitios tienen especies compartidas mientras que el valor va disminuyendo a 0 cuando no existen especies compartidas (Escolástico et al., 2013; Villareal, 2004).

### **3.3.10 Análisis Filogenético**

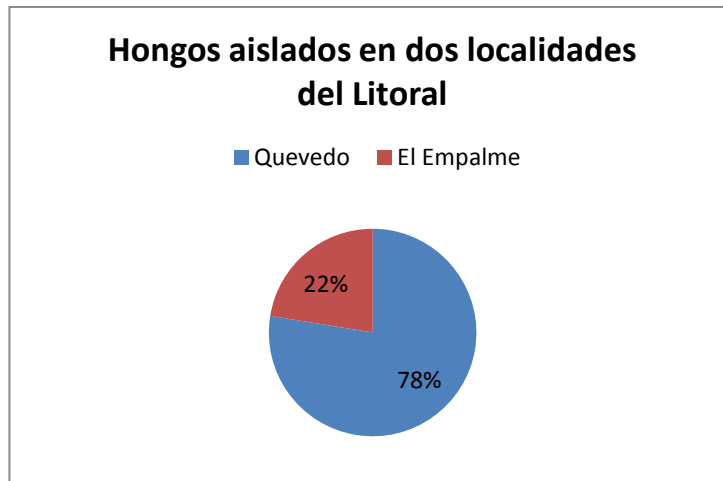
Las secuencias consenso identificadas se alinearon con el software Cluster W implementado en el programa MEGA 6.0 (Tamura, Stecher, Peterson y Kumar, 2013). Las secuencias alineadas fueron analizadas filogenéticamente mediante el método de distancia *Neighbor- Joining*. Para evaluar el soporte de las ramas se utilizó el análisis estadístico *Bootstrap* con 2.500 repeticiones.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

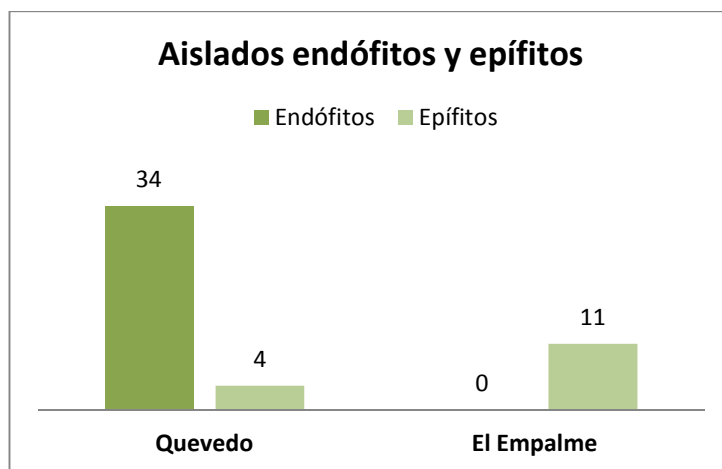
#### 4.1 Hongos endófitos y epífitos obtenidos de *Citrus sinensis*.

Se recolectaron 60 naranjas y 36 hojas de las dos localidades. Un total de 49 hongos tanto endófitos como epífitos fueron aislados de *Citrus sinensis*, Junio 2014, 38 aislados provenientes de Quevedo-Los Ríos (Localidad 1) y 11 provenientes de El Empalme-Guayas (Localidad 2) (figura 6). Treinta y cuatro hongos endófitos y cuatro hongos epífitos de Quevedo-Los Ríos y 11 epífitos de El Empalme-Guayas (figura 7).



**Figura 6. Porcentaje de hongos aislados en Quevedo- Los Ríos y El Empalme-Guayas, región litoral del Ecuador.**

La información generada muestra que diferentes partes de la planta de *Citrus sinensis* (hojas y frutos) constituyen un hábitat completo y proveen a los microorganismos fúngicos los recursos necesarios para sobrevivir (Anaya, 2003). Además, diferentes investigaciones han generado datos alrededor del mundo sobre la gran diversidad de hongos tanto endófitos como epífitos de diversas plantas (Alvindia y Natsuaki, 2008; Douanla-Meli et al., 2013; Khan et al., 2007; Kumar y Hyde, 2004; Palou et al., 2001; Salas, 2010).



**Figura 7. Hongos endófitos y epífitos aislados en Quevedo-Los Ríos y El Empalme-Guayas, región litoral ecuatoriana.**

Análisis globales sobre el resultado de la cantidad de aislados tanto endófitos como epífitos de las dos localidades se evidencian en la figura 7. La mayoría de estudios de estas dos micobiotas se han realizado por separado. No obstante, estudios simultáneos de estos dos tipos de hongos en un sola planta han generado información sobre las ventajas de la coexistencia de estas micobiotas en el vegetal; por ejemplo, Gao, Dai y Liu (2010) y también Herre et al. (2007) mencionan implicaciones favorables en la salud de la planta y posibles alternativas propias para su protección. También Kumar y Hyde (2004), Khan et al. (2007), Alvindia y Natsuaki (2008) y Douanla-Meli et al. (2013) dan punto a favor al conocimiento de la biodiversidad microbiana. Además, Rosa et al. (2011) mencionan el posible descubrimiento de metabolitos y sustancias usadas para el tratamiento de enfermedades tanto vegetales como humanas provenientes de hongos endófitos y epífitos.

La metodología de obtención de hongos epífitos (hojas y frutos aparentemente sanos) y endófitos (frutos con lesiones superficiales) fue igual para las dos localidades. A pesar de esto la cantidad de hongos aislados tuvo una diferencia notable.

Diversos autores comentan que la micoflora tanto epífita como endófitas puede variar cuando esta se encuentran bajo distintas condiciones ambientales. La diferencia entre estos dos tipos de hongos provenientes de las dos localidades expuestas en esta investigación

podría ser explicada mediante lo examinado por Lindow y Brandl (2003), Agrios (2005), Salas (2010) los cuales mencionan que la temperatura, la humedad, la presencia y cantidad de fuentes potenciales de inóculo (Photita, Lumyong, Lumyong y Hyde, 2001) afectan directamente las características de crecimiento, germinación, abundancia y otros procesos de colonización fúngica.

#### **4.2 Identificación molecular de hongos aislados de *Citrus sinensis*.**

Mediante el análisis molecular de las regiones ITS se identificaron 24 hongos de diferentes especies tanto endófitos como epífitos presentes en *Citrus sinensis*, provenientes de una localidad de Quevedo-Los Ríos y una de El Empalme-Guayas.

En la localidad de Quevedo-Los Ríos se lograron identificar 16 hongos endófitos provenientes de tejido con lesiones superficiales, un solo hongo epífito procedente de la superficie de la naranja y una especie epífita de la superficie de hojas del árbol (tabla 2).

En la localidad de El Empalme-Guayas no se identificó hongos endófitos, pero si, un género y una especie de hongo epífito procedentes de la superficie del fruto y cuatro hongos epífitos provenientes de la superficie de hojas (tabla 3).

##### **4.2.1 Endófitos en muestras sintomáticas de *Citrus sinensis*.**

Al centrar la atención solamente en los hongos endófitos aislados de tejidos con lesiones superficiales del fruto de las dos localidades de este estudio resalta una gran diversidad de géneros y/o especies fúngicas (tabla 2).

La localidad de Quevedo reportó con mayor frecuencia a *Colletotrichum gloesporioides*, *Lasiodiplodia theobromae* anamorfo de *Botryosphaeria rhodina*, *Epicoccum nigrum*, *Nigrospora oryzae*, *Epicoccum* sp. y *Fusarium* sp. Todos estos microorganismos pertenecen al *phylum* Ascomycota (Mycobank, 2015). Estos microorganismos son géneros y especies endófitas comúnmente presentes en diferentes plantas sintomáticas como se expone a continuación:

El estudio de Sánchez (2009) muestra el aislamiento de *Colletotrichum* sp. a partir de lesiones de *Dactylis glomerata* (pasto). Además Gamboa (2006) afirma que *Colletotrichum* es uno de los taxones más ampliamente distribuidos en ambientes tropicales, también presenta cepas morfológicamente variables y un número amplio de hospederos. *Epicoccum* sp., *Epicoccum nigrum* fueron identificados en *Dactylis glomerata* y *Epicoccum* sp. en aislados de lesiones de *Holcus lanatus* (heno blanco) (Sánchez, 2009). Por otro lado, microbiota endófito de *Citrus limon* muestra a la familia Glomerellaceae (familia a la cual pertenece el género *Colletotrichum*) como una de las más abundantes en la investigación de Duanla-Meli et al. (2013). Rubini et al. (2005) estudiaron ramas sintomáticas de la enfermedad de “la floración de bruja” provenientes de cacao, de las cuales se aislaron microorganismos endófitos como *Colletotrichum gloesporioides* y *Lasiodiplodia theobromae*. *Nigrospora oryzae* y el género *Fusarium* con su especie *oxysporum* fueron revelados como hongos endófitos en hojas de *Eucalyptus citricola* Hook (Kharwar, Gond, Kumar y Mishra, 2010).

*Daldinia eschscholtzii*, *Leptoshaerulina chartarum*, *Ampelomyces* sp., *Didymosphaeria futilis*, *Edenia gomezpompae* y *Phaeosphaeriopsis* sp. son especies endófitas aisladas en este estudio pertenecientes a Quevedo. Representan microbiota no comúnmente observada pero encontradas en diferentes estudios:

La investigación llevada a cabo por Yuyama, Pereira, Maki y Ishikawa (2013) muestra a *Daldinia eschscholtzii* como un endófito proveniente de muestras de madera en senescencia de la región norte de Brasil. *Leptoshaerulina chartarum* (telomorfo de *Pithomyces chartarum*) fue estudiado por Abler (2003). Muestras de césped fueron recolectadas para su análisis, en vista de que este género representa problemas en diferentes tipos de césped en climas húmedos en USA. Sun, Wang, Lu, Okane y Kakishima (2012) aislaron a *Ampelomyces* sp. como endófito de *Salsola collina* y *Peganum nigellastrum*, ambas sintomáticas. *Didymosphaeria* es un género de hongos ubicuos reportados como endófitos, saprofíticos y patógenos. *Didymosphaeria futilis* fue descrita como endófito/saprofito a partir de tallos de rosa en senescencia (Ariyawasa et al., 2014). *Edenia gomezpompae* fue aislada de hojas de *Callicarpa acuminata* (Quintana Roo, México) como hongo endófito (Macías et al., 2008). Posteriormente este hongo fue evaluado por Yu et al. (2010) para la producción de quinolonas como metabolito con poder antimicrobiano. El género

*Phaeosphaeriopsis* con su especie *musae* fue aislado como endófito fúngico a partir de hojas enfermas de arroz (*Oryza sativa* L.) (Suada et al., 2012).

A pesar de la existencia de diferentes investigaciones donde se evidencia la gran diversidad de endófitos que las lesiones de diferentes plantas poseen la localidad de El Empalme-Guayas de este estudio no evidenció la presencia de hongos endófitos. Explicaciones para sustentar este suceso son mencionadas por diferentes autores, así:

Furhman y Campbell (1998) citados por Gamboa (2006), por ejemplo, destacan que el mayor inconveniente y posible problema para la estimación de la diversidad microbiana endófitas es la incapacidad de algunos microorganismos de crecer en medios de cultivo en laboratorio. Rosa et al. (2011), por su parte, comentan que cerca de un 50% de hongos endófitos no producen conidias o esporas en medios de cultivo artificiales disminuyendo la posibilidad de identificación.

Otra razón de la ausencia de hongos endófitos en El Empalme-Guayas podría ser la expuesta por Santamaría y Bayman (2005). Ellos mencionan que a pesar de que varios hongos pueden estar en la superficie de la muestra pocos de ellos son capaces de penetrar el tejido. Para corroborar esta información, Sánchez et al. (2013) mencionan que el hongo endófito produce diferentes factores de virulencia (metabolitos, exoenzimas, etc.) y a su vez, la planta produce diferentes mecanismos de defensa (mecánicos físicos y/o bioquímicos), cuando este “antagonismo balanceado” sucede se logra encontrar microorganismos endófitos en el tejido.

Al igual que esta investigación, diferentes estudios han mostrado la presencia desigual de microbiota endófitas en plantas de la misma especie. Hanada et al. (2010) indican que la diferencia en la abundancia y/o composición de especies endófitas de un solo tipo de planta puede deberse a condiciones propias del hospedero como su composición química, su etapa fisiológica de crecimiento o condiciones ambientales alrededor de la planta. Este tipo de razones son consideradas variables que el investigador no puede controlar, por consiguiente información adicional sobre la semejanza de estas variables en la recolección de muestras sería un punto clave para evitar grandes diferencias en los resultados.

**Tabla 2**

*Identificación molecular basada en la región ITS de hongos en tejido del fruto (TN), en superficie del fruto (SN) y superficie de hojas (HN) de Citrus sinensis pertenecientes a la localidad de Quevedo-Los Ríos*

Código del aislado	Código secundario	Parte del aislado	Hongos	% de identidad	Valor E	No.GenBank
1. ELSI 1	AM48	TN	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	90%	2e-132	KM265786.1
1.ELSI 2	AM2	TN	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	98%	0.0	KF151849.1
1.ELSI 4	AM4	TN	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	100%	0.0	HQ607815.1
1.ELSI 5	AM29	TN	<i>Epicoccum nigrum</i>	86%	2e-110	KP276617.1
1.ELSI 6	AM19	TN	<i>Ampelomyces</i> sp.	78%	6e-28	AF035780.1
1.ELSI 8	AM23	TN	<i>Epicoccum nigrum</i>	100%	0.0	HQ728258.1
1.ELSI 9	AM18	TN	<i>Epicoccum</i> sp.	99%	0.0	HQ630972.1
1.ELSI 10	AM20	TN	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	99%	0.0	HQ631015.1
1. ELSI 14	AM15	TN	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99%	0.0	JQ580526.1
1. ELSI 15	AM49	TN	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	100%	0.0	KM406107.1
1.ELSI 16	AM6	TN	<i>Didymosphaeria futilis</i>	99%	0.0	KM246243.1
1.ELSI 17	AM14	TN	<i>Nigrospora oryzae</i>	98%	0.0	HQ608152.1
1.ELSI 19	AM5	TN	<i>Fusarium</i> sp.	97%	0.0	JQ761035.1
1. ELSI 20	AM35	TN	<i>Edenia gomezpompae</i>	83%	2e-25	KJ957792.1
1. ELSI 21	AM25	TN	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp	99%	0.0	GU017524.1
1.ELSI 23	AM9	TN	<i>Alternaria longissima</i>	95%	0.0	KJ572139.1
1.ELSI 24	AM3	TN	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99%	0.0	HM575258.1
1.ELSI 25	AM13	TN	<i>Fusarium</i> sp.	95%	0.0	JQ760019.1
1.ELSI 28	AM8	TN	<i>Alternaria</i> sp.	100%	0.0	KM268674.1
1.ELSI 30	AM7	TN	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99%	0.0	HM575258.1
1.ELSI 32	AM21	TN	<i>Nigrospora oryzae</i>	99%	0.0	HQ608152.1
1. ELSI 33	AM46	TN	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	99%	0.0	KJ398148.1
1.ELSI 35	AM11	TN	<i>Epicoccum</i> sp.	82%	4e-114	KC178644.1
1. 26	AM10	SN	<i>Diaporthe</i> sp.	100%	0.0	FJ799938.1
1. HOJAS 0.2	AM30	HN	<i>Epicoccum nigrum</i>	92%	0.0	HM467833.1
1. HOJAS	AM34	HN	<i>Epicoccum nigrum</i>	95%	0.0	HQ728258.1

#### 4.2.2 Epífitos en muestras asintomáticas de *Citrus sinensis*

Zhang et al. (2010) afirman que a pesar de saber la importancia y potencial de los microorganismos epífitos, los estudios científicos enfocados en este tipo de micoflora son escasos.

En la localidad de Quevedo- Los Ríos se identificó como micoflora epífita a *Diaphorte* sp. y *Epicoccum nigrum* (tabla 2).

*Diaphorte* sp. ha sido reportado por varios autores como epífito de plantas (Bungihan et al., 2011; Liu, Ding, Deng y Chen, 2009; Sim, Jiun, Khoo, Lee y Cheah, 2010).

La localidad de El Empalme-Guayas presentó varios géneros y especies de epífitos, como *Epicoccum* sp., *Bipolaris* sp., *Pithomyces chartarum*, *Leptosphaerulina chartarum*, *Epicoccum nigrum* y *Cladosporium cladosporioides* (tabla 3).

*Epicoccum* fue uno de los géneros de hongos epífitos encontrado con mayor frecuencia en el estudio de Caretta, Piontelli, Picco y Del Frate (1999). También Stohr y Dighton (2004) identificaron al género *Epicoccum* con su especie *purpuracens* como epífito que recubre a *Vaccinium macrocarpon* (arándano americano) y la misma especie fue uno de los hongos epífitos con mayor aislamiento en la investigación de Kharwar et al. (2010) a partir de hojas de *Eucalyptus citrícola* Hook.

El género *Bipolaris* con sus seis especies: *cynodontis*, *ellisii*, *hawaiiensis*, *papendorffii*, *spicifera* y *victoriae* fueron hongos epífitos aislados de pastizales provenientes de Kenia (Caretta et al, 1999). Larran, Mónaco y Alippi (2001) identificaron a *Bipolaris cynodontis* como endófito de tomate; mientras que, Larran, Rollán, Bruno, También, Alippi y Urrutia (2002) identificaron a *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. como endófito en hojas de soya.

La investigación llevada a cabo por Stohr y Dighton (2004) muestra a *Pithomyces chartarum* como uno de los hongos que comúnmente se encuentra en la filósfera de *Vaccinium macrocarpon* (arándano americano). Además *P. chartarum* y su teleomorfo *Leptosphaerulina chartarum* estuvieron presentes como epífitos de pastizales de Kenia (Caretta et al., 1999). Por otro lado, Martini et al. (2009) identificaron a *L. chartarum* como

endófito de *Vitis vinifera*. Kharwar et al. (2010) encontraron a *Cladosporium cladosporioides* como epífita en hojas de *Eucalyptus citricola* Hook y a su vez fue aislado en menor cantidad como hongo endófito.

**Tabla 3**

***Identificación molecular basada en la región ITS de hongos en superficie del fruto (SN) y superficie de hojas (HN) de Citrus sinensis pertenecientes a la localidad de El Empalme-Guayas***

Código del aislado	Código secundario	Parte del aislado	Hongos	% de identidad	Valor E	No.GenBank
2. -2 2	AM16	SN	<i>Epicoccum nigrum</i>	100%	0.0	HQ728258.1
2. -2 9	AM36	SN	<i>Epicoccum nigrum</i>	99%	0.0	EU232716.2
2. -2 10	AM22	SN	<i>Epicoccum</i> sp.	99%	0.0	EF432273.1
2. H-15	AM45	HN	<i>Bipolaris</i> sp.	95%	0.0	JN116629.1
2. H-2 1	AM43	HN	<i>Pithomyces chartarum</i>	96%	0.0	HG518059.1
2. H-2 7	AM24	HN	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	99%	0.0	HQ607815.1
2. H-2 8	AM12	HN	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	99%	0.0	KJ596320.1

En el presente estudio *Bipolaris* sp., *Pithomyces chartarum*, *Leptosphaerulina chartarum*, *Epicoccum nigrum* y *Cladosporium cladosporioides* fueron reconocidos como hongos epífitos. La información de diferentes investigaciones también señala a estas especies como endófitos fúngicos. Es posible que al momento del muestreo de esta investigación, estos microorganismos estuvieran en la primera fase del ciclo de vida de hongos endófitos (Herre et al., 2007) (anexo 5). Esta primera fase se refiere al contacto de la espora con la superficie de la planta (fruto, hoja, etc.). Posterior al contacto se produce la germinación, la penetración del tejido y la colonización hasta la senescencia de la planta. Es por esta razón que también encontramos a algunos de estos géneros como endófitos en naranja.

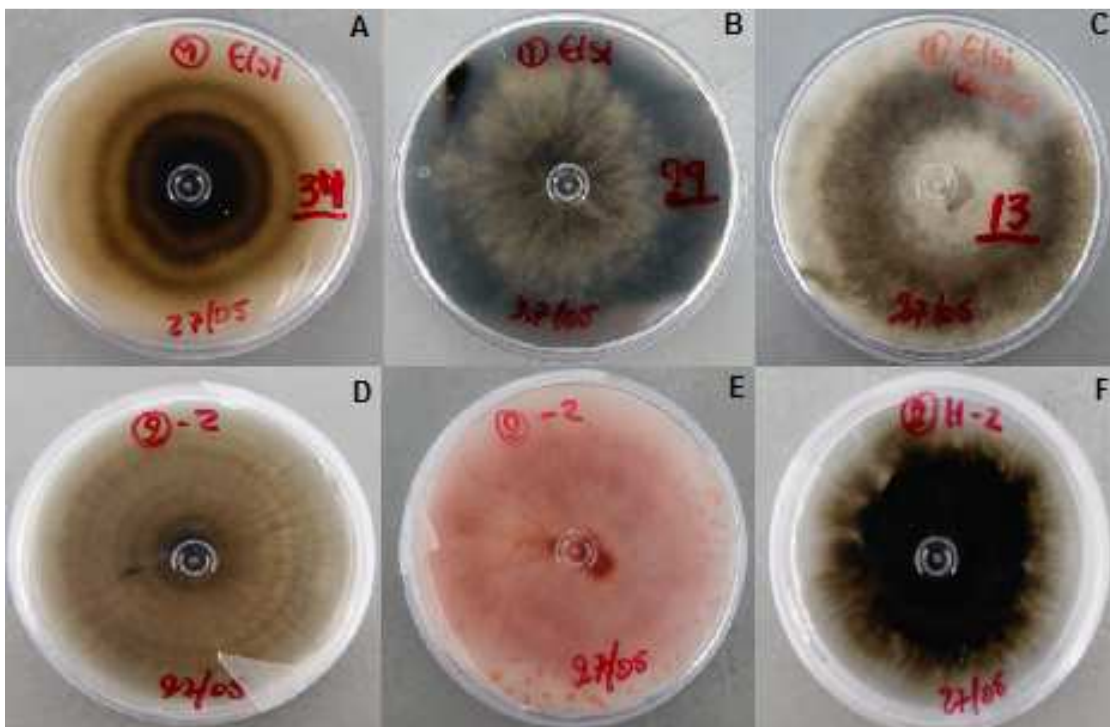
#### **4.2.3 Endófitos en tejido sintomático y epífitos en tejido asintomático.**

También podemos notar en este estudio que algunos géneros y especies constituyen tanto la micoflora endófito proveniente de frutos con lesiones de *C. sinensis*, como la epífita proveniente de hojas y frutos asintomáticos de *C. sinensis*. Así *Epicoccum* sp., *E. nigrum*, *L. chartarum*, *Diaporthe* sp. estuvieron presentes en las dos micofloras. Sanchez (2009)

menciona a Photita et.al. (2004), concordando con sus hallazgos y generando una hipótesis que expone que estos géneros y especies podrían representar microorganismos latentes en el hospedero. Podrían hallarse como epífitos y colonizar la superficie. Por cambios fisiológicos, ambientales, etc., estos mismos microorganismos llegan a ubicarse en el tejido sintomático convirtiéndose en endófitos de este. Inclusive, estos mismos hongos endófitos podrían convertirse en saprobios al empezar la senescencia de la planta (Promputtha et al., 2007).

#### 4.2.4 Pérdida de información

Bajo las condiciones de laboratorio usadas, 12 aislados de la localidad 1 y 4 aislados de la localidad 2 mostraron crecimiento micelial abundante (figura 8) pero su identificación molecular fue deficiente por consiguiente estos no constan en los resultados de este estudio.



**Figura 8.** Algunos aislados fúngicos con crecimiento micelial abundante provenientes de Quevedo-Los Ríos (A, B, C) y El Empalme-Guayas (D, E, F) que no pudieron ser identificados molecularmente.

Las razones de este suceso pudieron ser varias. Por ejemplo, un procesamiento erróneo al momento de la extracción de ADN por parte del investigador pudo dar como resultado un ADN de baja calidad enviado a secuenciar. Se debe considerar que para obtener una buena secuenciación, el ADN debió estar libre de sal y otros contaminantes, características que generan el nivel de pureza y calidad en el mismo. Otra razón de la pérdida de información en la secuenciación de algunos hongos en este estudio pudo ser la presencia excesiva de guanina y citosina en el ADN lo que dificultó el proceso de identificación (Oliva, 2004).

Por otra parte, el uso de cebadores con baja afinidad hacia estos hongos pudo constituir otra razón para la pérdida de información. A pesar de que la región ITS es eficaz para identificación de géneros fúngicos, en ocasiones, este mismo cebador no es específico para diferentes especies fúngicas lo que genera una escasa identificación si el hongo no posee afinidad. Muchos autores han usado diferentes cebadores para identificación fúngica molecular. Tanto para endófitos como para epífitos tenemos como posibilidades al ITS1f e ITS4 (Douanla-Meli, 2013), ITS1 e ITS 4 (Santamaría y Bayman, 2005; Sim et al., 2010; Yuan et al., 2010), ITS3 y NL4 (Takemoto et al., 2014).

#### **4.2.5 Endófitos y epífitos fúngicos como antagonistas.**

Muchas especies aisladas en esta investigación son productoras de metabolitos secundarios, los cuales son utilizados en biotecnología con el objetivo de generar diferentes productos para el bienestar vegetal y humano. Por ejemplo, en el ámbito biocontrolador, *Edenia gomezpompae* posee Preusomerina EG y Bisnaftoespirocetal que actúan como antifúngicos contra un patógeno universal *Fusarium oxysporum* (Sanchez-Fernandez et al., 2013). Endófitos como *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium* sp. mostraron actividad antagonista hacia *Phytophthora palmivora* (patógeno del cacao) (Hanada et al., 2010). En cambio en el ámbito humano, *Alternaria* sp., *Nigrospora* sp. y *Epicoccum* sp. son géneros que presentaron antagonismo contra bacterias patógenas en el hombre (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, etc) (Ramirez et al., 2006). También Gao et al. (2010) identificó el antibiótico 3-O-methylalaternin, altersolanol A producido por *Ampelomyces* sp. que actúa sobre patógenos como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Enterococcus faecalis*.

### 4.3 Análisis de patrones de biodiversidad existentes en la micoflora de naranja

La localidad de Quevedo muestra una **riqueza de especies** ( $S$ ) superior a la localidad de El Empalme (tabla 4).

**Tabla 4**

*Número de individuos y riqueza de hongos endófitos y epífitos identificados en Quevedo-Los Ríos y El Empalme-Guayas de la región litoral*

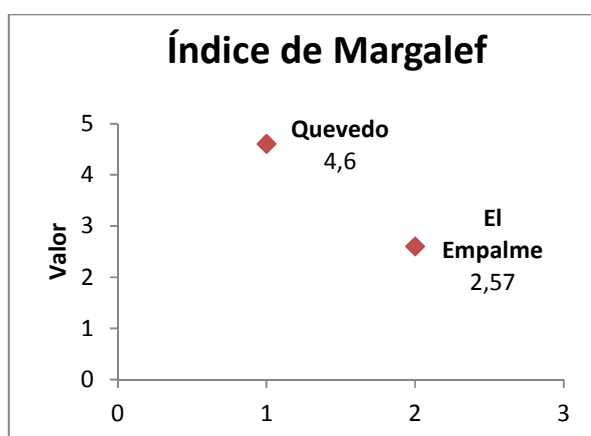
Hongos	Quevedo	El Empalme
<i>Fusarium</i> sp.	2	n.p
<i>Didymosphaeria</i> <i>futilis</i>	1	n.p
<i>Colletotrichum</i> <i>gloeosporioides</i>	3	n.p
<i>Alternaria</i> sp.	1	n.p
<i>Alternaria</i> <i>longissima</i>	1	n.p
<i>Diaporthe</i> sp.	1	n.p
<i>Epicoccum</i> sp.	2	1
<i>Ampelomyces</i> sp.	1	n.p
<i>Nigrospora</i> <i>oryzae</i>	2	n.p
<i>Epicoccum</i> <i>nigrum</i>	4	2
<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp	2	n.p
<i>Edenia</i> <i>gomezpompae</i>	1	n.p
<i>Daldinia</i> <i>eschsoltzii</i>	1	n.p
<i>Leptosphaerulina</i> <i>chartarum</i>	2	1
<i>Lasiodiplodia</i> <i>theobromae</i>	2	n.p
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	n.p	1
<i>Bipolaris</i> sp.	n.p	1
<i>Pithomyces</i> <i>chartarum</i>	n.p	1
<b>Riqueza (S)</b>	15 (16)	6
<b>Número de individuos</b>	26	7

n.p: no presente

**El índice de riqueza de Margalef** ( $D_{Mg}$ ) se encuentra directamente relacionado con el valor  $S$  y con el número total de individuos de cada localidad. Quevedo, al tener mayor valor  $S$ , obtuvo un mayor valor en este índice (4,6) (figura 9).

Los valores  $D_{Mg}$  generados en esta investigación variaron notablemente (figura 9) a pesar que el muestreo y el procesamiento de las muestras se los realizó evitando cambios en variables que afecten los resultados. Por ejemplo, el muestro en las dos localidades se

realizó a frutos del naranjo con lesiones físicas similares, frutos sin lesiones aparentes y hojas asintomáticas. El transporte y manejo de muestras fue el mismo. El procesamiento de cada muestra en el laboratorio fue igual para las dos localidades. Similar a lo sucedido en el presente estudio Girlanda et al. (2001) analizaron a *Cucumis sativus*, pepino común, bajo condiciones controladas de crecimiento (tiempo, temperatura, inoculación de químicos) en cinco ciclos de crecimiento. Los resultados variaron desde su primer ciclo hasta el quinto con respecto a los químicos usados: control, CHA0-Rif, CHA0-Rif (pME3424) y Metalaxyl. Así los  $D_{Mg}$  obtenidos fueron 3.9, 4.7, 5 y 4.6 respectivamente en el primer ciclo y en el quinto se obtuvo 5.1, 4.7, 4.6, 5.2. Se observa que a pesar de controlar la mayoría de variables posibles, los valores pueden variar significativamente. Yuan, Zhang, Lin y Kubicek (2010) analizaron la microbiota en muestras de raíces de *Oriza granulate* y se obtuvo un valor de 7.39.

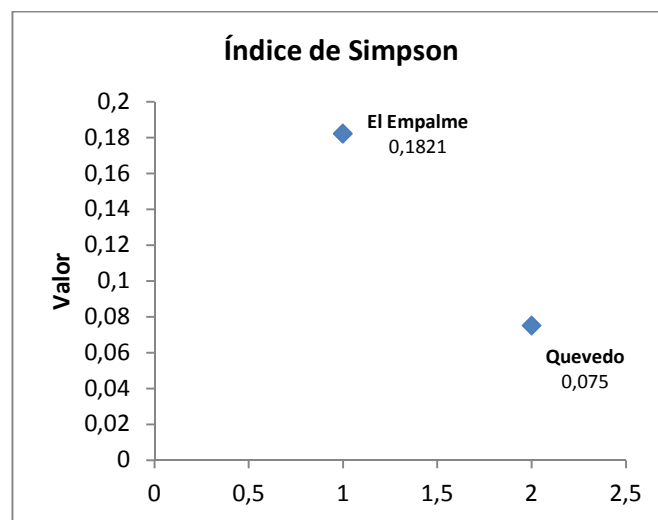


**Figura 9. Índice de Margalef ( $D_{Mg}$ ) de hongos endófitos y epífitos de la localidad de Quevedo-Los Ríos y de El Empalme-Guayas del litoral ecuatoriano.**

El estudio de Díaz et al. (2010) muestra valores  $D_{Mg}$  variados. La investigación se llevó a cabo en 9 sitios de la parte centro-oeste y 10 sitios del oeste de Estados Unidos. Se observa que el estado de Illinois por ejemplo, obtuvo índices de 0.55, 1.21 y 1.52 a pesar de ser un mismo estado. A su vez, al compararse con un estado aledaño y con puntos de muestreo cercanos se observa que Kentucky obtuvo 1.79, 0.71 y 1.11. En efecto, a pesar de poseer condiciones geográficas similares, analizar mismos serovares (Golden delicious) de *Malus x domestica* Borkh no se genera  $D_{Mg}$  iguales. Resultados semejantes a este estudio ya que

las localidades muestreadas fueron zonas geográficas similares, con clima semejante en época de verano (Junio-Diciembre) y recolección de frutos de *Citrus sinensis* se obtuvo también índices  $D_{Mg}$  variados.

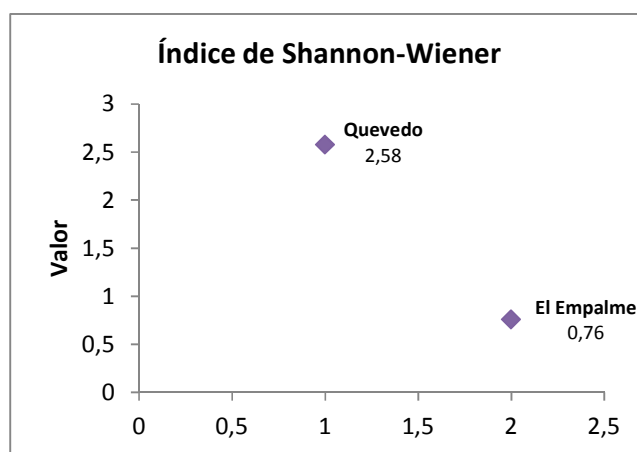
**El índice de Simpson ( $D$ )** representa la dominancia de especies dentro de la muestra; por ende, se interpretaría como la posibilidad de que al realizar un muestreo al azar dos individuos seleccionados pertenecieran a la misma especie (Escolástico et al., 2013; Marcial et al., 2012). La localidad de El Empalme obtuvo un valor mayor en este índice (figura 10). Este resultado se vio afectado directamente por la menor cantidad de especies e individuos de esta localidad. Tomando como referencia a una especie similar en las dos localidades (*Epicoccum nigrum*) el resultado puede interpretarse así: Quevedo posee cuatro individuos *Epicoccum nigrum* (dominancia de esta especie en el lugar muestreado). Esta localidad también posee 22 posibilidades más (22 individuos más) de que al realizar un muestreo estos no sean *E. nigrum* (tabla 4); por el contrario, El Empalme solamente obtuvo siete individuos de los cuales si se efectúa un muestreo al azar la posibilidad de que estos sean *E. nigrum* fue mayor (valor  $D$  mayor).



**Figura 10.** Índice de Simpson ( $D$ ) de hongos endófitos y epífitos de la localidad de Quevedo-Los Ríos y de El Empalme-Guayas del litoral ecuatoriano.

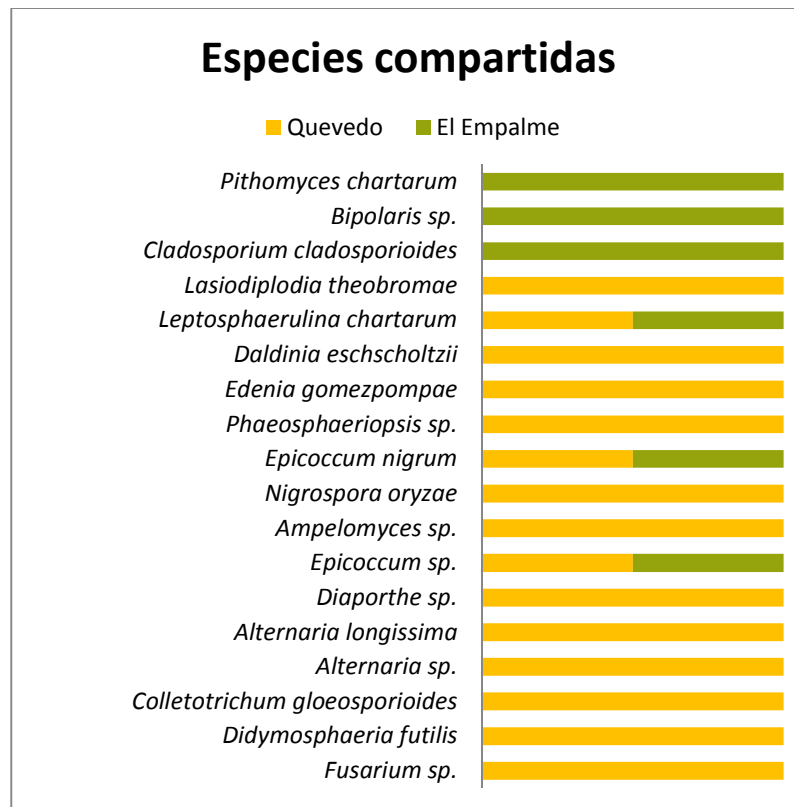
**EL índice de Shannon-Wiener** genera datos relacionados con la heterogeneidad de la muestra, es decir la variabilidad de las especies e individuos. El valor  $H'$  de Quevedo fue superior al de El Empalme (figura 11). Esto se debe a que Quevedo posee 12 especies diferentes adicionales en comparación con la segunda localidad (tabla 4). A pesar de que Quevedo presentó gran heterogeneidad (2,58) este resultado es bajo en comparación a diferentes estudios pero a su vez demuestra la gran variabilidad de especies que puede existir en este tipo de investigaciones. Yuan et al. (2010) obtuvieron un valor de 3.14 en estudios de *Oryza granulate*. Sánchez (2009) generó un valor  $H'$  de 4.2 en poblaciones de *Dactylis glomerata*.

Enfocando los resultados generados en este estudio de una manera diferente, se observa que a pesar de que Quevedo y El Empalme sean localidades próximas entre ellas, ubicadas en la parte centro de la región litoral del Ecuador, con muestras físicamente similares, con un clima seco en la temporada de verano (Junio-Diciembre) la variabilidad de heterogeneidad puede existir (figura 11). Por ejemplo, Díaz et al. (2010) muestran que North Caroline y Georgia obtuvieron un valor  $H'$  de 0.73 y 2.56 respectivamente a pesar de ser estados ubicados al sur-oeste del país, próximos entre ellos y con análisis de cultivares iguales de manzana.



**Figura 11.** Índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ) de hongos endófitos y epífitos de la localidad de Quevedo-Los Ríos y de El Empalme-Guayas del litoral ecuatoriano.

Para evaluar la equidad entre localidades se usó el **coeficiente de similitud de Jaccard** ( $I_j$ ), el que muestra las especies compartidas entre los dos lugares (figura 12). El valor  $I_j$  fue de 0,38. Solamente tres individuos con géneros y especies similares forman parte de las especies compartidas. Es por esta razón que el valor se acerca a cero. Kumar y Hyde (2004) obtuvieron un valor de 0.147, el mayor de las tres comunidades estudiadas; mientras que 0,23 fue el valor que Douanla et al. (2013) obtuvieron en su estudio. Recordemos que los resultados obtenidos con este coeficiente varían entre 0 y 1, el valor más alto se genera cuando los dos sitios tienen especies compartidas mientras que el valor va disminuyendo a 0 cuando no existen especies compartidas (Escolástico et al., 2013; Villareal, 2004).



**Figura 12.** Representación gráfica de especies compartidas de hongos endófitos y epífitos entre la localidad de Quevedo-Los Ríos y de El Empalme-Guayas del litoral ecuatoriano.

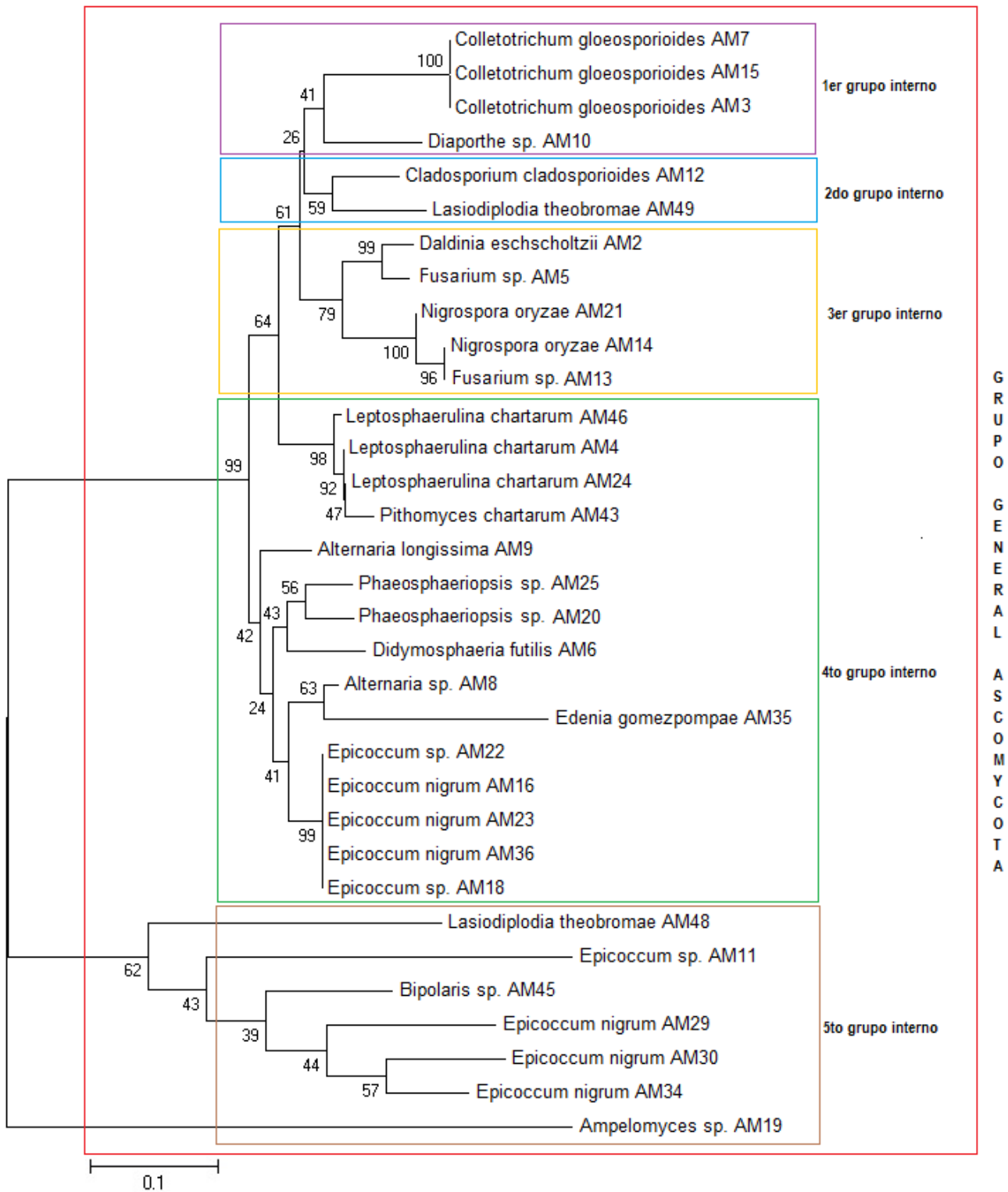
#### **4.4 Filogenia fúngica encontrada en *Citrus sinensis* mediante el método de *Neighbor-Joining* (NJ).**

Peña (2011) menciona que el análisis filogenético *NJ* genera grupos aislados basándose en la similitud de sus terminales y por ende agrupaciones de miembros similares. Yuan (2010) en su estudio usa *NJ* para agrupar a las diferentes especies fúngicas encontradas en raíces de *Oryza granulata*. En aquel árbol se evidencia la clasificación de dos *phylum* (Ascomycota y Basidiomycota) con sus respectivos órdenes y familias. Además, Cornejo (2014) estudió a *Phaseolus vulgaris* y sus especies endófitas. Como resultado obtuvo un dendograma *NJ* donde se evidencia dos *phylum*. La mayoría de especies endófitas en su estudio se encontraron en el *phylum* Ascomycota. Según lo mencionado, el dendograma resultado de esta investigación muestra un grupo general y cinco grupos internos (figura 13).

El grupo general está conformado solamente por miembros del *phylum* Ascomycota. Como sub división se obtuvo Pezizomycotina. Especies de este *phylum* son ecológicamente obicuos (fitopatógenos, patógenos de animales, madera, etc.) y varias especies participan en simbiosis y procesos ecológicos (Schoch et al., 2009; Spatafora et al. 2006). Pezizomycotina posee 10 clases: Sordariomycetes, Leotiomycetes, Lecanoromycetes, Lichinomycetes, Laboulbeniomycetes, Dothideomycetes, Pezizomycetes, Eurotiomycetes, Arthoniomycetes y Orbiliomycetes (Kumar, Healy, Spatafora, Blackwell y McLaughlin, 2012).

El primer grupo interno está conformado por *Colletotrichum gloeosporioides* y *Diaporthe* sp.. Los dos pertenecen a la clase Sordariomycetes, y al orden Glomerellales y Diaporthales respectivamente (Douanla-Meli et al., 2013; MycoBank, 2015).

El segundo grupo interno posee dos especies que encajan en la clase Dothideomycetes y subclase Dothydeomycetidae. *Cladosporium cladosporioides* del orden Capnodiales y *Lasiodiplodia theobromae* del orden Botryosphaeraiales (Díaz, 2010; MycoBank, 2015; Schoch et al., 2009).



**Figura 13.** Árbol filogenético NJ correspondiente a la relación de hongos endófitos y epífitos aislados de muestras de *Citrus sinensis* de dos localidades de la región litoral.

Sordariomycetes se clasifica en 14 órdenes. Los órdenes Glomerellales, Diaporthales, Hypocreales, Microascales, Ophiostomatales, Phyllachorales, Trichosphaeriales y Xylariales poseen especies fitopatógenas. Además, el orden Hypocreales y Xylariales registran varias especies de endófitos (Zhang et al., 2006).

El tercer grupo lo conforman una gran variedad de especies. Todas ellas pertenecen a la clase Sordariomycetes conformado por diferentes órdenes. *Daldinia eschscholtzii* pertenece al orden Xylariales, *Fusarium* sp. pertenece al orden Hypocreales y *Nigrospora oryzae* pertenece al orden Trichosphaeriales (Cornejo, 2014; Douanla-Meli et al., 2013; MycoBank, 2015).

El cuarto grupo interno está conformado por especies pertenecientes a la clase Dothideomycetes y subclase Pleosporomycetidae. Dentro de esta clase se evidencia 10 órdenes: Pleosporales, Hysteriales, Mytilinidiales, Patellariales, Botryosphaeriales, Jahnulales, Dothideales, Capnodiales, Myriangiales y Trypetheliales (Schoch et al., 2009). Todas las especies de este grupo pertenecen al orden Pleosporales.

Este orden es el más extenso de la clase Dothideomycetes. Comprende especies fúngicas que pueden ser halladas como endófitos, epífitos, saprobios, patógenos, en simbiosis y como parásitos en diferente vegetación. Pleosporales posee muchas familias, entre ellas tenemos a Botryosphaeriaceae, Dimeriaceae, Pleosporaceae, Venturiaceae, Leptosphaeriaceae, Phaeosphaeriaceae, Didymosphaeriaceae, etc.

*Pithomyces chartarum* y su anamorfo *Leptosphaerulina chartarum*, el género *Alternaria*, el género *Epicoccum* y *Edenia gomezpompae* pertenecen a la familia Pleosporaceae; mientras que *Phaerosphaeriopsis* y *Dydymosphaeria* pertenecen a la familia Phaeosphaeroaceae y *Didymosphaeria* respectivamente (MycoBank, 2015).

El quinto grupo en esta investigación está conformado por tres géneros antes mencionados. Además consta del género *Bipolaris* sp. y *Ampelomyces* sp. Especies pertenecientes a la clase Dothideomycetes, orden Pleosporales. La diferencia entre estos dos géneros es la familia a la que pertenecen. El primer género pertenece a la familia Pleosporaceae mientras que el segundo género es de la Familia Phaeosphaeroaceae (MycoBank, 2015).

Este grupo tiene géneros y especies similares a los anteriores grupos, pero está conformado con especies que al ser identificadas en el *GenBank* obtuvieron porcentajes de similitud bajos. *Ampelomyces* sp. obtuvo un 78% de similitud lo cual se evidencia en el árbol pues constituye una rama separada y única. La baja similitud de las secuencias de estas especies con la base de datos del *GenBank* se puede deber a una mala secuenciación del ADN. Este problema posiblemente sea por la baja calidad del ADN.

## CONCLUSIONES

- Hojas y frutos de *Citrus sinensis* constituyeron un amplio reservorio y fuentes ricas en micobiota endófito y epífita.
- El género endófito más abundante asociado a lesiones similares a sarna en naranjo dulce, *Citrus sinensis*, fue *Epicoccum*, seguido de *Fusarium*. Con menor frecuencia especies comúnmente aisladas a partir de vegetación: *Epicoccum nigrum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Leptosphaerulina chartarum* y *Lasiodiplodia theobromae*.
- La micoflora epífita proveniente de hojas y frutos de *Citrus sinensis* fue heterogénea. El género *Epicoccum* con su especie *nigrum* se aisló con mayor frecuencia. Se corrobora nuevamente que *Epicoccum* es un género ubicuo y además puede hallárselo tanto dentro de tejido como en superficie vegetal.
- La mayoría de géneros y especies fúngicas identificadas en este estudio han sido evaluadas en investigaciones previas, confirmando su producción de metabolitos secundarios con propiedades antagonistas.
- La localidad de Quevedo presentó mayor Riqueza de especies y por ende un resultado mayor en el índice de Margalef.
- Los índices de diversidad de Shannon-Wiever y Simpson arrojaron datos equilibrados. En las dos localidades evaluadas (Quevedo y El Empalme) se evidenció heterogeneidad y dominancia respectivamente.
- Las dos localidades generaron un coeficiente de similitud de Jaccard bajo (0,38) puesto que solamente cinco individuos de la micoflora endófito y epífita de los dos sitios fueron similares.

- Los resultados emitidos por el análisis filogenético basado en el método *NJ* fueron claros pues, el dendograma resultado generó agrupaciones de miembros similares y todos pertenecen a la división Ascomycota, sub división Pezizomycotina.

## RECOMENDACIONES

- Para obtener mayor cantidad de hongos microscópicos, se sugiere recolectar más muestras, ampliar los sitios de colección y épocas diferentes del año.
- La calidad del ADN interfiere directamente al momento de la identificación molecular, por ende, se recomienda seguir rigurosamente el protocolo de extracción y a su vez comprobar que la calidad del mismo se encuentre dentro de los parámetros establecidos.
- Con el objetivo de llegar a una identificación más allá de género fúngico, se recomienda amplificar otras regiones del ADN a más de la región ITS comúnmente utilizada.
- Se aconseja realizar una edición exhaustiva de las secuencias obtenidas, ya que este es uno de los pasos clave al momento de realizar el análisis filogenético y los índices de biodiversidad.
- Muestras procedentes de la naturaleza son propensas a estar constituidas por microbiota no identificada aún, por consiguiente se sugiere usar métodos más modernos para recuperar microorganismos viables no cultivables presentes.
- Además del método de análisis filogenético *Neighbor-Joining*, se aconseja usar otros métodos de análisis filogenéticos para complementar los resultados obtenidos.
- Investigaciones anteriores demuestran que gran cantidad de hongos endófitos y epífitos poseen potencial para ser usados biotecnológicamente, especialmente para biocontrol, lo cual alienta a los investigadores a enfocarse en esta prometedora área.

## REFERENCIAS

- Abler, S. (2003). Ecology and Taxonomy of *Leptosphaerulina* spp. associated with Turfgrasses in the United States. Recuperado de <http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-03282003-123427/unrestricted/SteveAbler-Thesis.pdf>
- Agustí, M. 2003. *Citricultura*. ISBN: 978-84-8476-157-7
- Alvindhia, D., & Natsuaki, K.. (2008). Evaluation of fungal epiphytes insolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. *Crop Protection*, 27 (8), 1200-1207. Recuperado de <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.elsevier-ee4c5a36-6eb2-32f6-b07b-b1c06bf5dec3>
- Anagnostopoulou, M., Kefalas, P., Papageorgiou, V., Assimopoulou, A., & Boskou, D. (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Elsevier*, 94, 19-25. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.09.047
- Anaya, A (2003). *Ecología Química*. ISBN-970-722-113-5
- Ariyawasa, H., Camporesi, E., Thambugala, K., Mapook, A., Kang, J., Alias, S., ... & Hyde, K. (2014). Confusion sorrounding *Didymosphaeria*- phylogenetic and morphological evidence suggest *Didymosphaeriaceae* is not a distinct family. *Phytotaxa*, 176 (1), 102-119. ISSN 1179- 3155
- Arnold, E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress challenges and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21 (2-3), 51-66. doi:10.1016/j.fbr.2007.05.003
- Arnold, A., Maynard, Z., Gilbert, G., Coley, P., & Kursar, T. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, 3, 267–274. doi: 10.1046/j.1461-0248.2000.00159.x

- Audesirk, T., Audesirk, G. & Byers, B. (2003). *Biología: la vida en la tierra*. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=uO48-6v7GcoC&dq=que+es+biodiversidad&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.ec/books?id=uO48-6v7GcoC&dq=que+es+biodiversidad&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- Backman, P., & Sikora, R. (2008). Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*, 46, 1-3. doi: 10.1016/j.biocontrol.2008.03.009
- Bungihan, M., Tan, M., Kitajima, M., Kogure, N., Franzablau, S., de la Cruz, T., Takayama, H. & Nonato, M. (2011). Bioactive metabolites of *Diaphorte* sp P133, an endophytic fungus isolated from *Pandanus amaryllifolius*. *Journal of Natural Medicines*, 65(3-4), 606-609. doi:10.1007/s11418-011-0518-x
- Cabildo, M., Claramut, R., & Claramut, T. (2013). *Ecología II: Comunidades y Ecosistemas*. Recuperado de [http://books.google.com.ec/books?id=BzRIAqAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=BzRIAqAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Camarena, G. (2012). Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares. *Revista Chapingo*, 18 (3), 409-421. doi:10.5154/r.rchscfa.2011.11.093
- Cambell, N. & Reece, J. (2007). *Biología*. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=QcU0yde9PtkC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=QcU0yde9PtkC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Caretta, G., Piontelli, E., Picco, A. & Del Frate, G. (1999). Some filamentous fungi on grassland vegetation from Kenya. *Mycopathology*, 145(3), 155-169. doi: 10.1023/A:1007038112075
- Chaves, N., Pocasangre, L., Elango, F., Rosales, F., & Sikora, R. (2009). Combining endophytic fungi and bacteria for the biocontrol of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne and for effects on plant growth. *Scientia Horticulturae*, 122 (3), 472-478. doi: 10.1016/j.scienta.2009.05.025
- Contreras, A., Cuevas, C., Goyenechea, I., & Iturbe, U. (2007). *La sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad*. (1ª Ed.). Recuperado de

[http://books.google.com.ec/books?id=udPjXgdYi\\_wC&pg=PA140&dq=analsiis+filogenetico&hl=es&sa=X&ei=TvhfVO6EBYaggwTC04PYBQ&ved=0CB8Q6AEwAA#v=onepage&q=analsiis%20filogenetico&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=udPjXgdYi_wC&pg=PA140&dq=analsiis+filogenetico&hl=es&sa=X&ei=TvhfVO6EBYaggwTC04PYBQ&ved=0CB8Q6AEwAA#v=onepage&q=analsiis%20filogenetico&f=false)

Crous, P., Verkley, G., Groenewald, J., & Samson, R., (2009). *Fungal Biodiversity*. ISSN 978-90-70351-77-9

Delgado, M., Rodolfi, M., Vásquez, S., & Icaza, X. (2009). *Actividad biológica de hongos endófitos presentes en dos plantas medicinales: Chuquiragua (Chuquiragua jussieui J.F.Gmel) y Ñachay (Bidens Andicola Kunth)*. Universidad Politecnica Salesiana.

<file:///E:/Naranja/End%C3%B3fitos%20en%20plantas%20medicinales%20Ecuador.pdf>

Dellosa, C. (2008). *Discovering Ecology*. ISBN 978-1-58037-719-5

Díaz, A. (2009). *Diseño estadístico de experimentos*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=0x0DW6dNiyAC&printsec=frontcover&dq=dise%C3%B1o+estadistico+de+experimentos+abel&hl=es&sa=X&ei=giGwVNvDOYXiggSW74CADA&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q=dise%C3%B1o%20estadistico%20de%20experimentos%20abel&f=false>

Díaz, M., Batzer, J., Harrington, T., Wang, A., Bost, S., Cooley, D., ..... & Gleason, M. (2010). Diversity and biogeography of Sooty Blotch and Flyspeck fungi on apple in the eastern and midwestern United State. *Phytopathology*, 100 (4), 345-355. doi:10.1094/PHYTO-100-4-0345

Douanla-Meli, C., Langer, E., & Moufao, F. (2013). Fungal endophyte diversity and community patterns in healthy and yellowing leaves of Citrus limon. *Fungal Ecology*, 6 (3), 212-222. doi: 10.1016/j.funeco.2013.01.004

Espinoza, L., Jiménez, M., & Peralta, E. (2009). Conservación de agentes patógenos y epífitos presentes en los cultivos de tomate, sandía y banano y sus beneficios para la

- investigación. *Revista Tecnológica ESPOL*, 22(1), 51-56. Recuperado de <http://rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/90/53>
- Etebu, E. & Nwauzoma, A., (2014). A review on sweet orange (*Citrus sinensis* L obsbeck): health, diseases and management. *American Journal of Research Communication*, 12 (2), 33-70. Recuperado de [http://www.usajournals.com/wpcontent/uploads/2014/01/Etebu\\_Vol22.pdf](http://www.usajournals.com/wpcontent/uploads/2014/01/Etebu_Vol22.pdf)
- FAOSTAT (2013). *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division*. Item Oranges, Area Americas, From Year 2013, To Year 2013, Aggregation. Average. Recuperado de <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>
- FAOWATER (2013). Land and Water Division.. *Crop water information: Citrus*. Recuperado de [http://www.fao.org/nr/water/cropinfo\\_citrus.html](http://www.fao.org/nr/water/cropinfo_citrus.html).
- Fundación Española de Nutrición (s.f). *Valor nutricional de las naranjas y clementinas*. Recuperado de <http://www.fen.org.es/imgpublicaciones/432011819.pdf>
- Gamboa, M. (2006). Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana*, 11 (1). Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v11s1/v11s1a01.pdf>
- Gao, F., Dai, C. & Liu, X. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 4(13), 1346-1351. ISSN 1996-0808
- García, F. (2009). *Ámbito Científico- Tecnológico- Formación Básica. PCPI*. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=gh0hoIdx5vQC&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.ec/books?id=gh0hoIdx5vQC&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- Gherbawy, Y. & Voigt, K. (2010). *Molecular Identification of Fungi*. doi: 10.1007/978-3-642-05042-
- Girlanda, M., Perotto, S., Moenne, Y., Bergero, R., Lazzari, A., Defago, G.,...& Luppi, A. (2001). Impact of Biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and a Genetically

- Modified Derived on the Diversity of Culturable Fungi in the Cucumber Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1851-1864. doi: 10.1128/AEM.67.4.1851-1864.2001
- Gray, J. & Elliott, M. (2009). *Ecology of Marine Sediments*. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=QoGfZm82XGQC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=QoGfZm82XGQC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Guisante, C., Barreiro, A., Maneiro, I., Riveiro, I., Vergara, A., & Vaamonde, A. (2006). *Tratamiento de datos*. Recuperado de [http://books.google.com.ec/books?id=AhNx24025ZoC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=AhNx24025ZoC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Hanada, R., Pomella, A., Costa, H., Bezerra, J., Loguercio, L., & Pereira, J. (2010). Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuacu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biology*, 114, 901-910. doi:10.1016/j.funbio.2010.08.006
- Heredia, M. (2007). *Estudio Agroindustrial en el Ecuador: Competitividad de la cadena de Valor y Perspectivas de mercado global: 2000-2004*. (Disertación de licenciatura no publicada). Recuperado de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Hernández, J. (2014). *Crecimiento y producción de naranja cv. Valencia Citrus sinensis (L.) Osbeck, como respuesta a la aplicación de correctivos y fertilizante* (Tesis de doctorado). Recuperado de la Universidad Nacional de Colombia, <http://www.bdigital.unal.edu.co/11842/>
- Herre, E., Mejía, L., Kylo, D., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A. & Van Bael, S. (2007). Ecological implication of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, 8 (3), 550-558. doi: 10.1890/05-1606
- Huang, W., Cai, Y., Hyde, K., Corke, H. & Sun, M. (2008). Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity*, 33, 61-75. ISSN 1560-2745

- Huang, Y., Wang, J., Zheng, Z. & Su, W. (2001). Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalotaxus fortunei* and *Torreya grandis*. *Federation of European Microbiological Societies. Immunology and Medical Microbiology*, 31, 163-167. PII. S0928-8244 (01)00255-3
- Hyun, J. (2011). Pathological characterization and molecular analysis of *Elsinoe* isolates causing scab diseases of citrus in Jeju Island in Korea. *Plant Disease*, 85(9), 1013-1017. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.9.1013>
- INEC (2013 a). *Visualizador de estadísticas agropecuarias del Ecuador ESPAC*. Cultivos permanentes, naranja-fruta fresca, superficie, resumen general. <http://200.110.88.44/lcds-samples/testdrive-remoteobject/main.html#app=dbb7&9270-selectedIndex=1>
- INEC (2013 b). *Visualizador de estadísticas agropecuarias del Ecuador ESPAC*. Cultivos permanentes, superficies perdidas por diferentes causas, resumen general. <http://200.110.88.44/lcds-samples/testdrive-remoteobject/main.html#app=dbb7&9270-selectedIndex=1>
- Khan, R., Shahzad, S., Choudhary, M., Khan, S., & Ahmad, A. (2007). Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (AIT.) R. Br. *Pak. Journal Botanical*, 39 (6), 2233-2239. Recuperado de [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/39\(6\)/PJB39\(6\)2233.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/39(6)/PJB39(6)2233.pdf)
- Kharwar, R., Gond, S., Kumar, A., & Mishra, A. (2010). A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citricola* Hook., and their antimicrobial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (11), 1941-1948. doi: 10.1007/s11274-010-0374-y
- Kim, K., & Hyun, J. (2007). Nonhost-associated proliferation of intrahyphal hyphae of citrus scab fungus *Elsinoe fawcetti*. Refining the perception of cell-within-a-cell-organization. *Micron*, 38 (6), 565-571. doi: 10.1016/j.micron.2006.10.007
- Kumar, D., & Hyde, K. (2004). Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity*, 17, 69-90. Recuperado de <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/17-6.pdf>

- Kumar, T., Healy, R., Spatafora, J., Blackwell, M. & McLaughlin, D. (2012). *Orbilia* ultrastructure, character evolution and phylogeny of *Pezizomycotina*. *Mycologia*, *104*(20), 462-476. doi: 10/3852/11-213
- Kunta, M., Rascoe, J., B. de Sa, P., Timmer, L., Palm, M., V.da Graca, ... & Skaria, M. (2013). Sweet orange scab with a nez sacab disease "syndrome" of citrus in the USA associated with *Elsinoe australis*. *Tropical Plant Pathology*, *38*(3), 203-212. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762013005000003>
- Kurtzman, C., & Fell, J. (2011). *The yeast: a taxonomic study*. Recuperado de [http://books.google.com.ec/books?id=yfg79rlIFIkC&dq=neighbor+joining+que+es&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.com.ec/books?id=yfg79rlIFIkC&dq=neighbor+joining+que+es&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- Lacap, D., Hyde, K. & Liew, E. (2003). An evolution of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity 12*: 53-66. Recuperado de <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD12-53-66.pdf>
- Larran, S., Mónaco, C. & Alippi, H. (2001). Endophytic in leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. *World Journal of Microbiology y Biotechnology*, *17*(2), 181-184. doi: 10.1023/A:1016670000288
- Larran, S., Rollán, C., Bruno, H., Alippi, H. & Urrutia, M. (2002). Endophytic fungi in healthy soybean leaves. *Invest.Agr.:Prod.Prot.Vegetal*, *1*(17), 173-178. Recuperado de [http://www.inia.es/GCONTREC/PUB/fungi2\\_1161160547796.pdf](http://www.inia.es/GCONTREC/PUB/fungi2_1161160547796.pdf)
- Lindow, S. & Brandl, M. (2003). Minireview: Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(4), 1875-1883. doi: 10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003
- Liu, K., Ding, X., Deng, B. & Chen, W. (2009). Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology*, *36*(9), 1171-1177. doi: 10.1007/s10295-009-0598-8
- McBride, S., French, R., Schuster, G., & Ong, K. (2010). *Guía de enfermedades de los cítricos. Guía rápida de identificación de enfermedades emergentes de los cítricos*

de Texas. Recuperado de <http://hidalgo.agrilife.org/files/2012/01/Guia-rapida-de-identificacion2.pdf>

Macías, M., Hernández, B., Jiménez, M., González, M., Glenn, A., Hanlin,... & Anaya, A. (2008). Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry* 69(5): 1185-1196. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.12.006

Maczulak, A. (2010). *Biodiversity: Conserving Endangered Species*. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=WM0flbmDrLsC&dq=what+is+biodiversity/+niches&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.ec/books?id=WM0flbmDrLsC&dq=what+is+biodiversity/+niches&hl=es&source=gbs_navlinks_s)

Manner, H., Buker, V., Easton, D. & Ward y C. (2006). Citrus species (citrus). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Permanent Agriculture Resources (PAR), Hawaii, USA, 35.

Mehrotra, R. & Aggarwal, A. (2013). *Fundamentals of Plant Pathology*. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=5h\\_ZAgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=5h_ZAgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

Miyamoto, M. & Cracraft, J. (1991). *Phylogenetic Analysis of DNA Sequences*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=1wqvNgz58JQC&pg=PA73&dq=sequences+of+DNA&hl=es&sa=X&ei=6RBBVc-UOoWVNoLmgYgE&ved=0CDsQ6AEwAg#v=onepage&q=sequences%20of%20DNA&f=false>

Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L. & Cuadrado, C. (2010). *Tablas de composición de alimentos*. Recuperado de <http://www.copal.es/export/sites/default/contenidos/descargas/noticias/Valornaranja-sclementinasTablas.pdf>

- Moreno, C. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad*. Recuperado de <http://www.sea-entomologia.org/PDF/M&TSEA01.pdf>
- Muhoho, S., ThiLan Phi, N. & Sawamura, S. (2009). Chemical composition of peel essential oils of sweet oranges (*Citrus sinensis*) from Uganda and Rwanda. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12 (1), 26-33. doi: 10.1080/0972060X.2009.10643687
- Ochoa, J., Hernández-Montiel, L., Latisnere-Barragán, H., León de La Luz, J., y Larralde-Corona, C. (2007). Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranjas *Citrus sinensis* L. Osbeck cultivada en Baja California sur, México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(5), 352-359. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=72450505>
- Oliva, R. (2004). *Genética Médica*. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=9sCJ80bEsRsC&dq=calidad+para+secuenci+r+ADN&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.ec/books?id=9sCJ80bEsRsC&dq=calidad+para+secuenci+r+ADN&source=gbs_navlinks_s)
- Olumei, O., Ojighen, V. & Ejembi, E. (2006). The nutritive potentials of sweet orange (*Citrus sinensis*) rind in broiler production. *International Journal of Poultry Science*, 5 (7), 613-617. ISSN 1628-8356
- Orozco, L & Somarriba, E. (2005). Árboles maderables en fincas de cacao orgánico del Alto Beni, Bolivia. *Agroforestería en las Américas*, 43-44, 46-53. Recuperado de <http://orton.catie.ac.cr/REPDOCA/A2331E/A2331E.PDF>
- Orwa et al. (2009). *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Rutaceae. sweet orange. *Agroforestry Database* 4.0. 1-5. Recuperado de [http://www.worldagroforestry.org/treedb/AFTPDFS/Citrus\\_sinensis.pdf](http://www.worldagroforestry.org/treedb/AFTPDFS/Citrus_sinensis.pdf)
- Osono, T. (2008). Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of camellia japonica: seasonal and leaf age-dependent variations. *Micology*, 100 (3) 387-391. doi: 103852/07-110R1
- Palou, L., Usall, J., Pons, J., & Viñas, I. (2001). Microflora epífita de los frutos y ambiental de mandarina (Clemnules) en Tarragona. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.*, 16 (2).

- 258-272. Recuperado de [http://www.inia.es/gcontrec/pub/palou\\_1161157924156.pdf](http://www.inia.es/gcontrec/pub/palou_1161157924156.pdf)
- Passarger, E. (2009). *Genética Texto y Atlas*. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=bgQ\\_xyJYkigC&dq=polimorfismo&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.ec/books?id=bgQ_xyJYkigC&dq=polimorfismo&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- Pedroni, L. & Morera, M. (2002). *Biodiversidad: el problema y los esfuerzos que se realizan en Centroamérica*. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=ghwOAQAIAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=ghwOAQAIAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Peterson, J., Dwyer, J., Beecher, G., Bhagwat, S., Gebhardt, S., Haytowitz, D. & Holden, J. (2006). Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literatura. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S66-S73. doi: 10.1016/j.jfca.2005.12.006
- Peña, C. (2011). Métodos de Inferencia Filogenética. *Revista Peruana de Biología*, 18(2), 265-267. ISSN 1561-0837
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P. & Hyde, K. (2001). Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Dor Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research*, 105(12), 1508-1513. doi: 10.1017/S0953756201004968.
- Piccinelli, A. L., Mesa, M. G., Armenteros, D. M., Alfonso, M. A., Arevalo, A. C., Campone, L. & Rastrelli, L. (2008). HPLC-PDA-MS and NMR Characterization of C-Glycosyl flavones in a hydroalcoholic extract of *Citrus aurantifolia* leaves with antiplatelet activity. *Journal of Agriculture, Food and Chem*, 56(7), 1574–1581. doi: 10.1021/jf073485k
- Prats, G. (2006). *Microbiología Clínica* (1ª Ed.). Recuperado de [http://books.google.com.ec/books?id=TdsoWPEYaoUC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=TdsoWPEYaoUC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

- Promega Corporation. (2010). *Technical Manual Wizard® genomic DNA purification kit. Instruction for Use of Products A1120, A1123, A1125 and A1620*. Recuperado el 23 agosto del 2014 de la página <http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/wizard%20genomic%20dna%20purification%20kit%20protocol.pdf>
- Promptutha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E., Hyde, K. & Jeewon, R. (2007). A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology* 53, 579-590. doi: 10.1007/s00248-006-9117-x
- PRO ECUADOR. Instituto de promoción de exportaciones e inversiones. (2012). *Análisis sectorial de frutas no tradicionales*. Recuperado de [http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/11/PROEC\\_AS2012\\_FRUTAS.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/11/PROEC_AS2012_FRUTAS.pdf)
- Ramírez, J., Delgado, E., Rodolfi, M., & Solveig, T. (2006). Actividad antagónica de hongos endófitos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas. *Boletín Micológico*, 21, 49-53. Recuperado de [http://www-3.unipv.it/det/micologia/endofitos\\_ecuador.pdf](http://www-3.unipv.it/det/micologia/endofitos_ecuador.pdf)
- Redman, R., Dunigan, D. & Rodríguez, R. (2001). Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader?. *New Phytologist* 151, 705-716. Recuperado de <http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1104&context=plantpathpapers>
- Ríos, M. (2010). *Control biológico de la Antracnosis (Colletotrichum gloeosporioides Penz) en tomate de árbol (Solanum betaceum), en el Ecotipo: Amarillo puntón, mediante hongos endófitos antagonistas*. (Disertación de licenciatura no publicada). Recuperado de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Cuenca. <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/3806/1/UPS-CT001974.pdf>
- Rogg, H. (2000). *Manual: Manejo integrado de plagas en cultivos de la amazonia ecuatoriana*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=X->

uTHzXmJloC&printsec=frontcover&dq=manejo+integrado+de+plagas+en+cultivos  
+de+la+amazonia&hl=de&sa=X&ei=cKmuVNKbFsXgggSWIICIDA&ved=0CCQ  
Q6AEwAA#v=onepage&q=manejo%20integrado%20de%20plagas%20en%20culti  
vos%20de%20la%20amazonia&f=false

Rondón, V. & Rodríguez, M. (2006). Hongos endófitos en plantaciones de mango “Haden” de la planicie de Maracaibo, Venezuela. *Revista de Facultad de Agronomía*, 23 (3), 273-284. ISSN 0378-7818

Rosa, L., Vieira, M., Coa, B., Johann, S., Alves, T., Zani, C. & Rosa, C. (2011). Endophytic fungi of tropical forests: a promising source of bioactive prototype molecules for the treatment of neglected diseases. *Drug Development - A Case Study Based Insight into Modern Strategies*. doi: 10.5772/27783

Rubini, M., Silva, R., Pomella, A., Maki, C., Araújo, W., Santos dos, D. & Azevedo, J. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches’ Broom disease. *International journal of biological Sciences*, 1, 24-33. ISSN 1449-2288

Sánchez, R., Sánchez, B., Sandoval, Y., Ulloa, A., Armendáriz, B., García, M. & Macías, M. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista de Especialidades en ciencias Químico-Biológicas*, 16 (2), 132-146. Recuperado de <http://www.revistas.unam.mx/index.php/tip/article/view/43299>

Salas, A. (2010). *Aislamiento e identificación de endófitos y epífitos en hojas de café colectadas en dos zonas de Costa Rica y su posible empleo como biocontroladores de Mycena citricolor*. (Disertación de licenciatura no publicada). Recuperado de Instituto tecnológico de Costa Rica <http://bibliodigital.itcr.ac.cr/xmlui/handle/2238/2912>

Schoch, C., Crous, P., Groenewald, E., Boehm, t., Burgess, J., Gruyler,... & Grube, M. (2009). A class-wide phylogenetic assessment of *Dothideomycetes*. *Studies of Mycology*, 64, 1-15. doi: 10.3114/sim2009.64.01

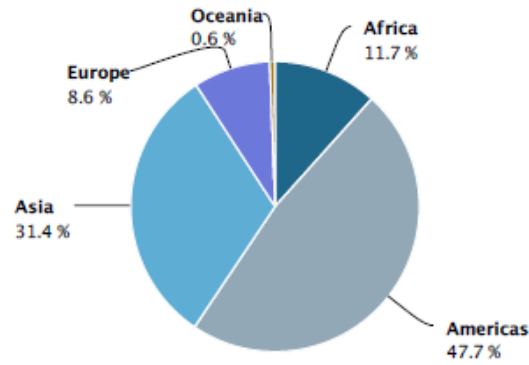
- Schuller, M., Carter, I., James, G., Halliday, C., & Slots, T. (2010). *PCR for clinical microbiology: an Australian and international perspective*. doi: 10.1007/978-90-481-9039-3
- Schurlz, B. & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109 (6), 661-686. doi:10.1017/S095375620500273X
- Schulz, B., Rommert, A., Dammann, U., Aust, H. & Strack, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism?. *Mycological Research*, 103 (10), 1275-1283.
- Sharma, P. (2004). *Plant pathology*. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=L1Qm4vdHNncC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=L1Qm4vdHNncC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Sum, Jiun, S., Khoo, C., Lee, L. & Cheah, Y. (2010). Molecular diversity of fungal endophytes isolated from *Garcinia mangostana* and *Garcinia parvifolia*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(4), 651-658. doi: 10.4014/jmb.0909.09030
- Solanas, A. & Sierra, V. (1992). Bootstrap: fundamentos e introducción. *Anuario de Psicología*, 55, 143-154. Recuperado de <http://www.raco.cat/index.php/anuariopsicologia/article/viewFile/61175/88740>
- Spatafora, J., Lutzoni, F., Lumbsch, T., Aptroot, A., Roux, C. Miller, A, .... & Schoch, C. (2006). A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. *Mycologia*, 98(6), 1018-1028. doi:10.3852/mycologia.98.6.1018
- Stephenson, J., Morss, J. & Burnett, G. (1834). *Medical Botany; Or, Illustration and Description of the Medicinal Plants of the London, Edinburgh, and Dublin Pharmacopoeias*. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=HrwOAAAAYAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=HrwOAAAAYAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Stohr, S. & Dighton, J. (2004). Effects of species diversity on establishment and coexistence: a phylloplane fungal community model system. *Microbial Ecology*, 48(3), 431-438. doi: 10.1007/s00248-003-1064-1

- Stone, J., Bacon, C. y White, J. (2000). An overview of endophytic microbes: endophytism defined. *Microbial endophytes*. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?hl=en&lr=&id=c\\_kuo5WD6GUC&oi=fnd&pg=PA3&dq=An+overview+of+endophytic+microbes:+endophytic+defined.+Microbial+endophytes&ots=0M7J9eNsii&sig=3W\\_Bbyuq7pI04T-1gmG7yDgtMrQ#v=onepage&q=An%20overview%20of%20endophytic%20microbes%3A%20endophytic%20defined.%20Microbial%20endophytes&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=en&lr=&id=c_kuo5WD6GUC&oi=fnd&pg=PA3&dq=An+overview+of+endophytic+microbes:+endophytic+defined.+Microbial+endophytes&ots=0M7J9eNsii&sig=3W_Bbyuq7pI04T-1gmG7yDgtMrQ#v=onepage&q=An%20overview%20of%20endophytic%20microbes%3A%20endophytic%20defined.%20Microbial%20endophytes&f=false)
- Thermo Fisher Scientific (2009). NanoDrop 2000/2000 Spectrophotometer, V1.0 *User Manual*. Recuperado de <http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CAD/CAD%20Documents/Product%20Manuals%20&%20Specifications/Molecular%20Spectroscopy/UV%20Visible%20Spectrophotometers/Spectrophotometer%20Systems/NanoDrop/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>
- Tidora, C. & Darai, G. (2011). *The Springer index of Viruses*. doi: 10.1007/978-0-387-95919-1
- Tovar, C. (2008). *Evaluación de la capacidad antagonista "in vivo" de aislamientos de Trichoderma spp. frente al hongo fitopatógeno Rhizoctonia solani*. (Disertación de licenciatura no publicada). Recuperado de Pontificia Universidad Javeriana, Bogota de la página: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis98.pdf>
- United States Department of Agriculture. (2014). *National Nutrient Database for Standard Reference Release 26*. NDB No.09200, Description oranges, raw, all commercial varieties food group fruits and fruit juices. Recuperado el 13 de mayo del 2014, de <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods>
- Villareal, H., Álvarez, M., Córdoba, S., Escobar, F., Fagua, G., Gast, F.,... & Umaña, A. (2004). Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. *Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt*. Recuperado de [http://www.zin.ru/animalia/coleoptera/pdf/villareal\\_et\\_al\\_2004.pdf](http://www.zin.ru/animalia/coleoptera/pdf/villareal_et_al_2004.pdf)

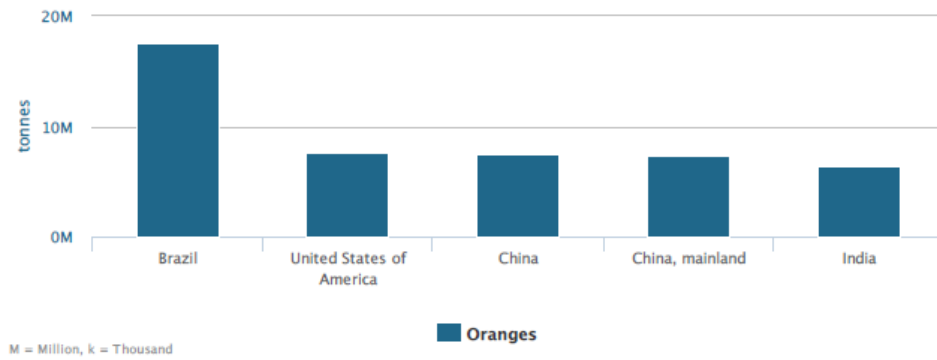
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P. & Qin, L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbial Research*, 165(6), 437-449. doi: 10.1016/j.micres.2009.11.009
- Yuan, Z., Zhang, C., Lin, F. & Kubicek C. (2010). Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Applied and environmental microbiology*, 76(5), 1642-1652. doi: 10.1128/AEM.01911-09
- Yuyama, K., Pereira, J., Maki, C. & Ishikawa, N. (2013). *Daldinia eschscholtzii* (Ascomycota, Xylariaceae) isolated from the Brazilian Amazon: taxonomic features and mycelial growth conditions. *Acta Amazónica*, 43(1), 1-8. ISSN 0044-5967
- Zavala, J. (2005). *Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=RcMak8yKAHcC&printsec=frontcover&q=manual+de+tecnicas+basicas+de+biologia+molecular&hl=de&sa=X&ei=76muVMiml4ycNu-IgrgO&ved=0CB0Q6AEwAA#v=onepage&q=manual%20de%20tecnicas%20basicas%20de%20biologia%20molecular&f=false>
- Zhang, B., Bai, Z., Hoefel, D., Wang, X., Zhang, L. & Zuming, L. (2010). Microbial diversity within the phyllosphere of different vegetable species. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Recuperado de <http://www.formatex.info/microbiology2/1067-1077.pdf>
- Zhang, Y., Crous, P., Schoch, C. & Hyde, K. (2012). Pleosporales. *Fungal Diversity*, 53, 1-221. doi: 10.1007/s13225-011-0117-x

## ANEXOS

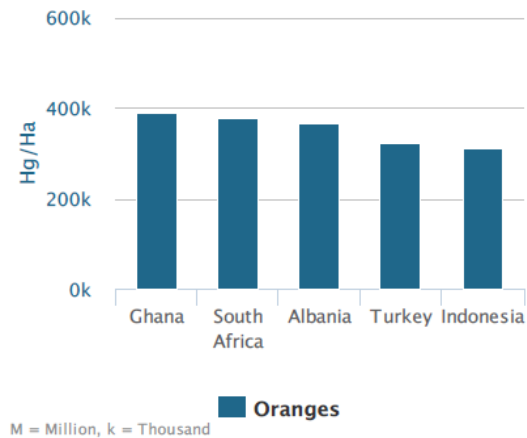
**Anexo 1. Porcentaje de producción de naranja por regiones. Por FAOSTAT, 2013.**



**Anexo 2. Toneladas de producción de los 5 mejores productores del mundo. Por FAOSTAT, 2013.**



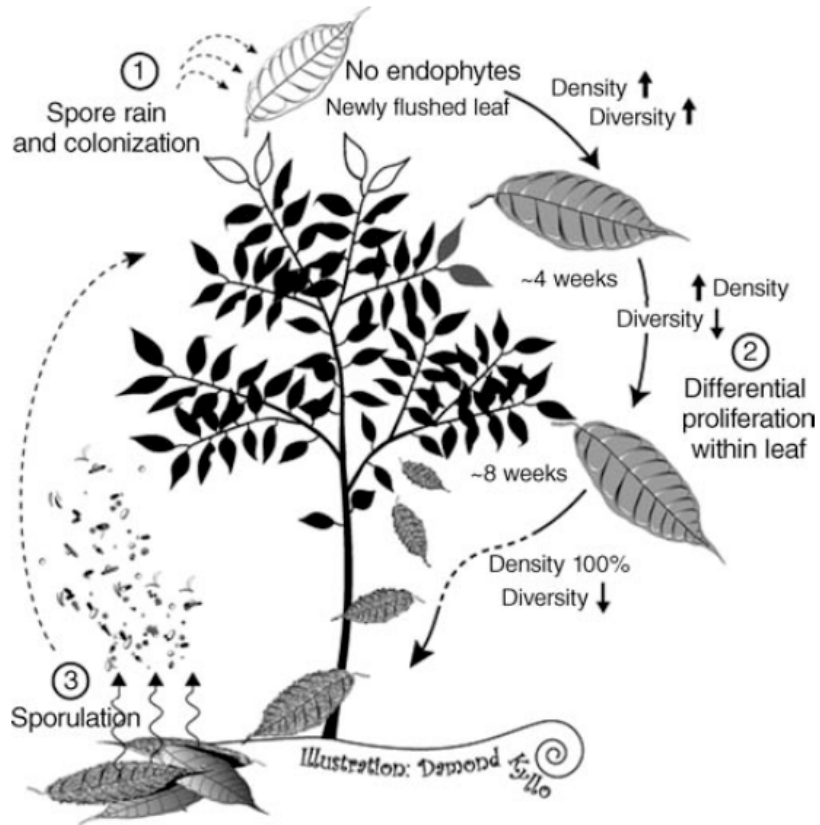
**Anexo 3. Cinco países con mejor rendimiento del cultivo en producción. Por FAOSTAT, 2013.**



**Anexo 4. Base de datos importantes en Bioinformática. Por Patnaik, 2012.**

<i>Information</i>	<i>Database</i>	<i>Link</i>
Nucleic acid sequence	Gen Bank	<a href="http://www.ncbi.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?bd = Nucleotide">http://www.ncbi.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?bd = Nucleotide</a>
All known nucleotides and protein sequences	NCBI's Gen Bank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank</a>
	DNA Data Bank of Japan (DDBJ)	<a href="http://www.ddbj.nig.ac.jp">http://www.ddbj.nig.ac.jp</a>
	EMBL	<a href="http://www.ebi.ac.UK/embl/">http://www.ebi.ac.UK/embl/</a>
Catalogue of human genetic and genomic disorder	OMIM	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/</a>
Genome sequence	SRS at EMBL/FBI Entrez Genome	<a href="http://srr.ebi.ac.UK">http://srr.ebi.ac.UK</a>
<i>S. cerevisiae</i> genome information	Saccharomyces genome database (SGD)	<a href="http://genome.www.stanford.edu/saccharomyces/">http://genome.www.stanford.edu/saccharomyces/</a>
Mouse genetics and genomics	Mouse Genome Database (MGD)	<a href="http://www.informatics.jax.org/">http://www.informatics.jax.org/</a>
Protein functional sites	PROSITE	<a href="http://www.expasy.ch.prosite/">http://www.expasy.ch.prosite/</a>
	PRINTS	<a href="http://www.bioinform.man.ac.UK/dbrowser/PRINTS/">http://www.bioinform.man.ac.UK/dbrowser/PRINTS/</a>
	SMART	<a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a>
Protein sequence	Gen Bank	<a href="http://www.tigr.org/tbl/">http://www.tigr.org/tbl/</a>
	SWISS-PROT at EXPASY	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?bd = protein">http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?bd = protein</a>
	PIR	<a href="http://www.expasy.ch/spro/">http://www.expasy.ch/spro/</a>
Protein structure	Protein Data Bank	<a href="http://www.ndrf.georgetown.edu/">http://www.ndrf.georgetown.edu/</a>
Protein 3D folds	SCOP	<a href="http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/">http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/</a>
Protein pathways	KEGG	<a href="http://www.genome.ad.jp/kegg/">http://www.genome.ad.jp/kegg/</a>
Biochemical and Biophysical Information	ENZYME	<a href="http://www.ndrf.georgetown.edu/pirwww/search/textresid.html">http://www.ndrf.georgetown.edu/pirwww/search/textresid.html</a>

**Anexo 5. Ciclo de vida propuesto para hongos endófitos tropicales en su planta hospedera. Por Herre et.al., 2007.**



**Anexo 6. Algunas hojas asintomáticas provenientes de El Empalme-Guayas.**



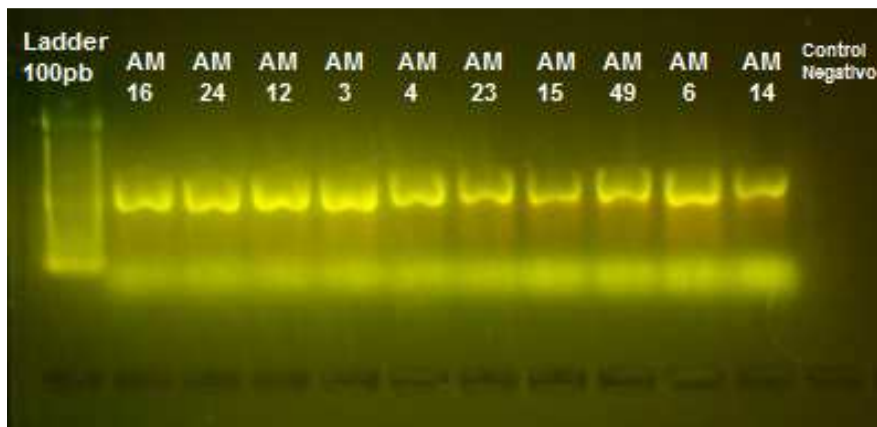
## **Anexo 7. Metodología de extracción de ADN.**

Este procedimiento se llevó a cabo mediante el uso del *kit* de extracción de ADN, *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega). La extracción se realizó en base al protocolo para el aislamiento de ADN genómico de tejido vegetal recomendado por el fabricante (Promega, 2010). Primero, se rasparon aproximadamente 40 mg del micelio del hongo usando un bisturí estéril, el micelio se lo colocó en un microtubo de 1,5 ml en donde se agregó arena de cuarzo para facilitar la lisis celular. Después de esto se añadió 600 µl de solución de lisis y se agitó mediante vortex de uno a tres segundos. Las muestras fueron incubadas a 65 °C por 15 minutos. Para eliminar la presencia de ARN se añadió a las células lisadas tres µl de solución de RNasa y se mezcló la muestra por inversión de dos a cinco veces. Después se volvió a incubar la mezcla a 37 °C por 15 minutos. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente durante cinco minutos para posteriormente añadir 200 µl de solución de precipitación de proteínas, y se las agitó vigorosamente con vortex por 20 segundos. Las muestras fueron centrifugadas por tres minutos a 15.000 revoluciones por minuto (rpm), en donde las proteínas formaron un pellet; por lo cual, el sobrenadante que contiene el ADN fue removido cuidadosamente y transferido a un tubo *ependorf* limpio de 1,5 ml. Para la precipitación de ADN se colocó al sobrenadante 600 µl de isopropanol a T° ambiente, se lo mezcló generosamente por inversión hasta que se formó un pellet de ADN y se lo centrifugó a 15.000 rpm por un minuto a T° ambiente. El sobrenadante se decantó cuidadosamente. Para lavar el ADN se añadió 600 µl de etanol 70 %, fue agitado mediante inversión. Una vez que se lavó el ADN, este fue centrifugado a 15.000 rpm por 1 minuto a T° ambiente. Finalmente, se retiró cuidadosamente el etanol y se invirtió el tubo sobre una toalla de papel limpia por 15 minutos para lograr un secado al aire libre. Para re suspender el ADN se añadió 100 µl de Solución de Rehidratación y se incubó a 65 °C por una hora. El ADN fue almacenado a 2-8 °C.

## Anexo 8. Uso del Espectrofotómetro NanoDrop

Según el Manual para el usuario NanoDrop 2000/2000 Spectrophotometer emitido por Thermo Fisher Scientific (2009), se encendió el equipo para lograr su estabilización, al igual que el computador para uso del software correspondiente. Como primer paso se blanqueó el lector colocando en la fibra óptica 1µl de solución de Rehidratación del Kit de Extracción de ADN usado, se secó con cuidado la fibra óptica usando papel absorbente propio del equipo. Seguidamente se procedió al análisis de cada una de las muestras colocando 1µl de ADN sobre la fibra óptica, se cerró el brazo superior del equipo, y se esperó observar el resultado visible en el software del equipo, después se abrió el brazo y se secó nuevamente con el papel absorbente.

## Anexo 9. Comprobación de existencia de producto de PCR provenientes de hongos presentes en *Citrus sinensis*.



## Anexo 10. Algunas secuencias consensus siendo procesadas en el programa Mega 6.

